

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ADRIANO TARGA DIAS SANTOS

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE O TEGMENTO PEDÚNCULO-PONTINO E OS  
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS ESTRIATAIS DO TIPO D<sub>2</sub> NA REGULAÇÃO  
DO SONO REM

CURITIBA  
2014

ADRIANO TARGA DIAS SANTOS

ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE O TEGMENTO PEDÚNCULO-PONTINO E OS  
RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS ESTRIATAIS DO TIPO D<sub>2</sub> NA REGULAÇÃO  
DO SONO REM

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Fisiologia, no  
Programa de Pós- Graduação em Fisiologia, Setor  
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Meira Santos  
Lima.

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha.

CURITIBA  
2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Targa, Adriano

Análise da interação entre o tegmento pedúnculo-pontino e os receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D<sub>2</sub> na regulação do sono REM.

/ Adriano Targa Dias Santos. – Curitiba, 2014.

84 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo de Meira Santos Lima

Co-orientador: Cláudio da Cunha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Sono – Aspectos fisiológicos 2. Sono REM 3. Dopamina 4. Substância Negra 5. Memória I. Título II. Lima, Marcelo de Meira Santos III. Cunha, Cláudio da IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612.821



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ADRIANO TARGA DIAS SANTOS** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à aprovação do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de junho de dois mil e quatorze.

**Professora Doutora Monica Levy Andersen**  
UNIFESP- Membro Titular

**Professora Doutora Maria Aparecida Barbato Frazão Vital**  
UFPR- Membro Titular

**Professor Doutor Marcelo de Meira Santos Lima**  
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dedico esse trabalho ao meu avô João Dias e à minha avó Valderez do Nascimento Santos pelos exemplos de responsabilidade, dedicação e superação.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais pela compreensão e apoio em diversos momentos, inclusive apoio financeiro. Eu sei que a dedicação de vocês e torcida é maior que qualquer coisa.

Aos demais familiares: avô, avós, tios, tias, irmãos, agradeço pelo carinho, dedicação e compreensão nos momentos de ausência. Um agradecimento especial aos meus primos-irmãos pelas conversas, companhia e brincadeiras. Vocês são as minhas “férias”, por muitas vezes foram um refúgio. Muitas vezes, saber que eu tenho pessoas como vocês é suficiente para mim.

Agradeço à Luana e aos seus familiares, por estarem ao meu lado boa parte desse período, dando apoio, encorajando nos momentos difíceis e, principalmente, pelo carinho e companhia. Obrigado por cuidarem da Pinha.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Marcelo Lima pelo compromisso, dedicação e, principalmente, pela confiança. Acredito que o mestrando é o principal responsável pelo trabalho, obviamente, mas uma boa orientação motiva a continuidade do trabalho e hoje eu me sinto motivado a continuar.

Agradeço ao professor Cláudio da Cunha, por ter aceitado o convite de co-orientação e pela colaboração com o laboratório.

Gostaria de agradecer à professora Anete Ferraz por ter me aceitado no laboratório, ao Bruno, Ana Márcia, Simone por todos os momentos de descontração e desabafos. Um agradecimento especial à Fabíola, pela amizade. Finalmente, terminamos!

Aos que já partiram, principalmente à Laura e à Dabna, pelas conversas intermináveis, desabafos e risadas.

Aos alunos de iniciação científica: Helenê, Diogo, Lauro, Flávia. Pelas ajudas nos testes comportamentais.

À professora Monica Andersen por ter aceitado a colaboração e permitido que eu fosse até São Paulo fazer parte dos experimentos, pela disponibilidade e pela confiança. Pelo exemplo de compromisso e dedicação ao trabalho. Um agradecimento especial ao Daniel, Karen, Lenise e Paulinha pela companhia e amizade. Foi um momento inspirador estar com vocês. Muito obrigado à Andréia, ao Dunga e ao Zé pelos auxílios em relação aos procedimentos e ao professor Ricardo

Machado, com os programas.

Aos professores do Departamento de Fisiologia que, de alguma forma contribuíram com o trabalho ou com a minha formação, principalmente ao professor Fernando Louzada e à professora Carolina Freire.

Aos secretários do Departamento de Fisiologia Rogério e Roberto pela disponibilidade e auxílio durante o período.

À técnica do Departamento de Farmacologia, Gisele, pelo auxílio na preparação das amostras e na quantificação neuroquímica.

Aos técnicos do Departamento de Fisiologia e meus amigos, Fábio (Caetano/Roberto/Relaxo) e Hely (Ilai/mosqueteira 1), obrigado pela companhia, risadas, piadas, corridas, cafés, lasanha, saídas.

Às minhas irmãs científicas do departamento de Fisiologia, Mariana, por todas as ajudas e ideias práticas para a realização dos experimentos. Pelos momentos de descontração. À Patsy\_patsy por todos os momentos, besteiras e terapias matinais. Ainda bem que a primeira impressão não é verdadeira. É muito bom conversar com você (quando eu não tenho que trabalhar).

Finalmente, às duas pessoas que mais contribuíram para a realização desse trabalho e que mais estiveram comigo durante esse período: Fofi e Nosedinha. Um agradecimento especial pra vocês, por todos os momentos de alegrias. Pelos finais de semana no laboratório, pelas 8 (x2) horas de trabalho diárias, pelas férias no laboratório, pela madrugada congelante no criostato, pela paciência. E, principalmente, por todos os momentos fora do laboratório. Esse trabalho também é de vocês. Muito obrigado.

Quando você chega ao limite de toda luz que você conhece,  
e está a ponto de dar um passo na escuridão,  
fé é saber que uma dessas coisas vai acontecer:  
vai haver chão, ou você vai ser ensinado a voar.

Richard Bach



## RESUMO

O papel do sistema dopaminérgico na regulação do sono é um tema que tem sido evidenciado principalmente em contextos fisiopatológicos como na doença de Parkinson, caracterizada por uma perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc). Alguns trabalhos demonstram uma grande semelhança anatômica e reciprocidade entre o tegmento pedúnculo-pontino (PPT), estrutura classicamente associada à regulação do sono, e a SNpc, sendo demonstradas também semelhanças funcionais. Dessa forma, o objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento recíproco do PPT e do sistema dopaminérgico na regulação do sono REM. Para isso, foi realizada uma cirurgia estereotáxica em ratos para infusão de ácido ibotênico no PPT, implantação de cânulas-guia no estriado dorsal e implantação de eletrodos para análise eletroencefalográfica. Após sete dias de recuperação, os animais foram privados de sono REM por 24 horas e, ao término desse período, foi realizada a administração de um antagonista para o receptor dopaminérgico do tipo D<sub>2</sub> (raclopride), de um agonista (piribedil) ou do veículo (DMSO) diretamente no estriado por meio das cânulas-guia. Logo em seguida, os animais foram destinados ao teste de reconhecimento de objetos para análise da memória e ao teste do campo aberto para análise do perfil motor. Posteriormente, os animais foram submetidos ao registro de sono por 24 horas, correspondendo ao período de sono rebote. Ao término desse período, os animais realizaram novamente os testes comportamentais, sendo logo em seguida eutanasiados. Foi realizada a retirada de estruturas encefálicas para posterior análise neuroquímica e a perfusão intracardiaca para análise imuno-histoquímica. Não foi observada influência da lesão no PPT, da privação de sono REM ou da modulação dos receptores dopaminérgicos no perfil locomotor dos animais. Em relação ao teste de memória, não foi observada influência da modulação dos receptores dopaminérgicos, no entanto, observou-se que a lesão foi capaz de promover um prejuízo na memória, surpreendentemente revertido pela privação de sono REM. Em relação ao registro de sono, observou-se uma interação entre o PPT e o sistema dopaminérgico, uma vez que só foi possível observar o efeito da privação de sono REM mediante o bloqueio dos receptores dopaminérgicos em animais não lesionados, enquanto que, nos animais com a lesão no PPT, o efeito da privação de sono REM foi observado mediante ativação dos receptores dopaminérgicos. Finalmente, foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de dopamina na SNpc e a porcentagem de sono REM. Dessa forma, é possível propor que o PPT, a SNpc e o estriado dorsal estão intimamente associados anatomicamente e funcionalmente, contribuindo para a regulação do sono REM.

Palavras-chave: Regulação do sono. Sono REM. Dopamina. Tegmento pedúnculo-pontino. Substância negra pars compacta. Memória.

## ABSTRACT

The role of the dopaminergic system in sleep regulation is a theme that has been evidenced especially in physiopathological contexts as in the case of Parkinson's disease, characterized by a loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta (SNpc). Some studies have demonstrated great anatomical similarity and reciprocity between the pedunculo pontine tegmental nucleus (PPT), a structure classically associated with sleep regulation, and the SNpc, with a functional similarity also being shown. Thus, the objective of this study was to investigate the reciprocal involvement between of the PPT and the dopaminergic system in REM sleep regulation. To this end, a stereotactic surgery was carried out for the infusion of ibotenic acid in the PPT, the implementation of guide cannulas in the dorsal striatum, and the implementation of electrodes for electroencephalographic analysis. After seven days of recovery, the animals were deprived of REM sleep for 24 hours and, by the end of that period, an antagonist for the D2-type dopaminergic receptor (raclopride), an agonist (piribedil) or the vehicle (DMSO) were administered directly to the striatum by means of guide cannulas. Right afterwards, the animals were directed to the object recognition test for memory analysis, and to the open field test for motor profile analysis. Later on, the sleep of the animals was recorded for 24 hours, corresponding to the sleep rebound period. By the end of that period, the animals took the behavioral tests once again, after which they were euthanized. Structures were removed for posterior neurochemical analysis, and the intracardiac perfusion was carried out for immunohistochemical analysis. It was not observed an influence of PPT lesions, REM sleep deprivation or modulation of dopaminergic receptors in the animals' locomotion profile. Pertaining to memory, the influence of the dopaminergic receptor modulation was not observed. There was, however, evidence that the lesion was able to promote a memory deficit, surprisingly reversed by the REM sleep deprivation. Concerning the sleep regulation, an interaction between the PPT and the dopaminergic system was noted, since it was only possible to observe the effect of REM sleep deprivation by blocking the dopaminergic receptors in non-lesioned animals, while in animals with PPT lesions the same effect was observed by activating the dopaminergic receptors. Finally, a positive correlation was shown between dopamine levels in the SNpc and the percentage of REM sleep. Therefore, it is possible to propose that the PPT, SNpc and the dorsal striatum are deeply associated both anatomically and functionally, contributing to the regulation of REM sleep.

Key-words: Sleep regulation. REM sleep. Dopamine. Pedunculo pontine tegmental nucleus. Substantia nigra pars compacta. Memory.

## LISTA DE SIGLAS

AP – Ântero-posterior  
ARAS – Sistema de ativação reticular ascendente  
ChAT – Colina acetil transferase  
DA – Dopamina  
DMH – Núcleo dorsomedial do hipotálamo  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DOPAC – Ácido 3,4-dihidroxifenilacético  
DPGi – Núcleo reticular paragigantocelular dorsal  
DRN – Núcleo dorsal da rafe  
DV – Dorso-ventral  
EEG – Eletroencefalograma  
EMG – Eletromiograma  
LC – Locus coeruleus  
LDT – Tegmento látero-dorsal  
LHA – Área hipotalâmica lateral  
LPT – Tegmento pontino lateral  
ML – Médio-lateral  
mPOA – Área pré-óptica medial  
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
MRF – Formação reticular mesencefálica  
PPT – Tegmento pedúnculo-pontino  
PRF – Formação reticular pontina  
PSREM – Privação de sono REM  
SCN – Núcleo supraquiasmático  
SLD – Núcleo sublaterodorsal  
SNpc – Substância negra pars compacta  
TH – Tirosina hidroxilase  
TMN – Núcleo túbero-mamilar  
vIPAG – Área cinzenta periaquedutal ventrolateral  
vIPOA – Área pré-óptica ventrolateral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 IMPORTÂNCIA DO SONO	13
1.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DO SONO	15
1.3 CLASSIFICAÇÃO DO SONO	17
1.4 REGULAÇÃO DO SONO	19
1.4.1 Influência do ritmo circadiano	19
1.4.2 Regulação da vigília	20
1.4.3 Regulação do sono não-REM	21
1.4.4 Regulação do sono REM	23
1.4.4.1 PPT na iniciação e manutenção do sono REM	26
1.4.4.2 Sistema dopaminérgico na regulação do sono REM	27
1.4.4.3 SNpc como um centro efector do sono REM	31
1.5 SONO E MEMÓRIA	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	36
<b>3 OBJETIVO</b>	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>4 METODOLOGIA</b>	38
4.1 ANIMAIS	38
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	39
4.4 PRIVAÇÃO DE SONO REM (PSREM)	40
4.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RDO)	41
4.6 CAMPO ABERTO (CA)	41
4.7 PROCEDIMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS (MICROINFUSÃO INTRAESTRIATAL)	42
4.8 REGISTRO ELETROFISIOLÓGICO DO PADRÃO VIGÍLIA-SONO	42
4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E COLINA ACETIL-TRANSFERASE (ChAT)	43

4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS PRESENTES NO ESTRIADO E SNpc POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ELETROQUÍMICO (HPLC-ED).....	44
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1 CAMPO ABERTO.....	46
5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS.....	46
5.3 REGISTRO DE SONO.....	48
5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA E SEU METABÓLITO PRESENTES NO ESTRIADO E SNpc POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC-ED).....	51
5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	54
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 IMPORTÂNCIA DO SONO

O sono é alvo de interesse desde os primórdios da civilização. Filósofos, psicólogos e pesquisadores tentam desvendar esse fenômeno intrigante, a partir do entendimento de seu funcionamento, regulação, funções e vantagens adaptativas. De certa forma, todos esses estudos contribuem para elucidar a importância do sono para os seres vivos (DATTA; MACLEAN, 2007; SIEGEL, 2011).

Entretanto, fazer uma descrição da importância do sono para os seres vivos não é uma tarefa simples, dada a quantidade de incertezas a respeito da função deste, apesar de inúmeras hipóteses presentes na literatura. Algumas hipóteses, apesar de grande aceitação pela comunidade científica, ainda apresentam incoerências e não conseguem fornecer respostas a todas as perguntas (RECHTSCHAFFEN, 1998).

Algo que dificulta a solução desse enigma é o fato de o sono não ser um processo homogêneo. Se for considerada apenas a divisão em sono não-REM e sono REM<sup>1</sup> olhar-se-á para processos distintos e que, provavelmente, não apresentam funções idênticas. Porém, quando se quer saber a função do sono à luz da evolução, ou seja, quando se procura a razão pela qual o sono surgiu e foi selecionado evolutivamente, pode-se olhar para esse fenômeno como algo único. No entanto, é improvável que ambos os estágios de sono tenham se originado ao mesmo tempo, da forma como hoje se relacionam. Assim, um novo questionamento surge: qual estágio deve ser considerado como o primeiro, como aquele que foi selecionado evolutivamente? Sono não-REM ou sono REM? Alguns trabalhos tentam solucionar essa parte do enigma analisando o sono de diferentes espécies de animais, no intuito de encontrar uma trajetória evolutiva. Muitos pesquisadores acreditam que essas questões podem ser abordadas com mais clareza e

---

<sup>1</sup> O termo sono REM deriva do termo inglês *rapid eye movement*. É importante salientar que o sono REM pode ser chamado de sono paradoxal, uma vez que o padrão eletrofisiológico encontrado durante esse período é semelhante ao que se observa durante a vigília enquanto ocorre uma perda do tônus muscular, característica atribuída ao sono. Em geral, prefere-se utilizar o termo sono REM para designar essa fase em humanos e o termo paradoxal para caracterizar essa fase em animais de experimentação. No entanto, por questões de padronização, nesse trabalho será utilizado o termo sono REM.

objetividade se o sono for analisado a partir de uma visão evolutiva. Dessa forma, é possível compreender a vantagem adaptativa desse fenômeno e, conseqüentemente, a sua função (RECHTSCHAFFEN, 1998; SIEGEL, 2005; ALLADA; SIEGEL, 2008; BLUMBERG, 2013).

Independentemente se a análise da importância do sono é realizada à luz da evolução ou de modo pontual, os estudos parecem convergir para as mesmas hipóteses. Muitos trabalhos sugerem que o sono tenha um papel restaurador, de forma que substâncias tóxicas provenientes da atividade neuronal acumuladas durante a vigília sejam eliminadas durante esse período. Xie e colaboradores (2013) observaram que camundongos apresentam um volume maior de fluido cérebro-espinhal e, conseqüentemente, uma eliminação mais eficiente de substâncias nocivas durante o sono ou quando anestesiados, se comparados a camundongos acordados (XIE *et al.*, 2013; ROTH; RATTENBORG; PRAVOSUDOV, 2010).

Outros trabalhos sugerem que o sono tenha papel fundamental na conservação de energia. Esses estudos partem do pressuposto de que seria inviável a manutenção constante de um estado como a vigília, no qual comportamentos que demandam grande quantidade de energia, como a caça ou a atividade reprodutiva, ocorrem. Assim, um estado de menos atividade motora e menor resposta a estímulos sensoriais teria um papel fundamental. Além disso, seria um momento oportuno para conservar a energia quando a possibilidade de encontrar nutrientes é menor e o risco de ser predado é muito grande (RECHTSCHAFFEN, 1998; SIEGEL, 2009).

Grande número dos estudos aponta um papel importante do sono no aprendizado e consolidação da memória, seja propiciando uma consolidação mais eficaz ou protegendo uma memória recente de influências externas. Apesar de existir muita controvérsia relacionada ao tema, o aprendizado e consolidação de memórias são mecanismos muito importantes, muitas vezes essenciais para a sobrevivência e sucesso adaptativo de uma espécie. Animais que precisam recordar locais com fontes de alimento, locais importantes para refugiar-se, identificar animais que representam ameaça ou até mesmo animais com os quais já tenham interagido são exemplos claros dessa importância (ELLENBOGEN; PAYNE; STICKGOLD, 2006; STICKGOLD; WALKER, 2007).

Tendo essa breve descrição em mente, observa-se como é intrigante o estudo do sono, uma vez que não se sabe exatamente, após anos de estudos, qual a razão ou razões pelas quais esse fenômeno existe. Com esse trabalho, espera-se dar uma contribuição referente aos mecanismos de regulação do sono, principalmente a respeito do papel do sistema dopaminérgico na regulação do sono REM e sua interação com o tegmento pedúnculo-pontino (PPT).

## 1.2 HISTÓRICO DO ESTUDO DO SONO

O estudo do sono apresentou avanço significativo a partir da invenção da eletroencefalografia (EEG) por Hans Berger, em 1924. Anteriormente a isso, o sono era descrito e estudado somente por observações comportamentais. Com a invenção do EEG, houve um interesse crescente por esse fenômeno pouco compreendido, porém intrigante (BERGER, 1929; DATTA; MACLEAN, 2007).

Loomis, Harvey e Hobart publicaram os primeiros estudos por volta do ano de 1935 no intuito de entender o significado dos padrões de ondas encontrados no EEG e correlacioná-los com os comportamentos observados. Algum tempo depois, foi possível dividir o sono em diferentes estágios, nomeados de A à E (LOOMIS; HARVEY; HOBART, 1935; LOOMIS; HARVEY; HOBART, 1936; LOOMIS; HARVEY; HOBART, 1937).

Klaue, em 1937, realizou o primeiro estudo utilizando animais para caracterização do sono. Em gatos, observou a presença de ondas de baixa frequência e, em um segundo momento, observou ondas de alta frequência. Além disso, encontrou outros comportamentos associados à alta atividade cortical, como a perda do tônus muscular (KLAUE, 1937).

Posteriormente, Aserinsky e Kleitman (1953) fizeram uma das descobertas mais importantes em relação ao tema: a presença dos movimentos oculares rápidos durante o sono, em humanos. Nesse estudo, esses autores associaram esses movimentos à presença de ondas de baixa amplitude e alta frequência no EEG, além de verificarem um aumento da frequência respiratória. Ainda, perceberam que a capacidade de relatar os sonhos era muito maior em indivíduos despertados durante o período de ocorrência dos movimentos oculares rápidos ou logo após o término desse fenômeno (ASERINSKY; KLEITMAN, 1953).



Dement e Kleitman realizaram uma descrição elaborada dos fenômenos relacionados ao sono, evidenciando uma associação entre o padrão de ondas de alta frequência e os movimentos oculares rápidos. Além disso, observaram que durante o momento em que ocorriam os movimentos oculares rápidos, ocorriam também movimentos corporais mais finos como movimentos das pernas, apesar da ausência do tônus muscular. Novamente, foi possível obter relatos de sonhos em uma proporção muito maior quando os indivíduos eram acordados logo após o período dos movimentos oculares rápidos. Finalmente, esses autores concluíram que o estímulo necessário para acordar um indivíduo que estava no estágio do sono no qual ocorriam os movimentos oculares rápidos deveria ser muito maior que o estímulo necessário para fazer o mesmo nos outros estágios do sono (DEMENT; KLEITMAN, 1957a, 1957b).

No ano seguinte, Dement realizou o primeiro experimento com a utilização de privação de sono REM. Nesse estudo, gatos foram privados de sono REM por um período de 1-3 dias para que se pudesse analisar o sono desses animais posteriormente. A partir disso, foram encontrados dois padrões de ondas no EEG durante o sono: o primeiro, caracterizado por ondas de alta amplitude, baixa frequência e alguns padrões de fusos; o segundo, designado como sono ativado, foi caracterizado por ondas de baixa amplitude e alta frequência. Esse estudo foi o primeiro a demonstrar o sono REM em um modelo animal, uma vez que foram observados movimentos das orelhas e vibrissas (DEMENT, 1958).

Em 1959, Jouvét e Michel, ao fazerem uma análise em gatos, observaram que a perda do tônus muscular e a presença de ondas de formato pontiagudo de alta frequência e alta voltagem na formação reticular pontina (PRF) se correlacionavam com a presença dos movimentos oculares rápidos e grande atividade cortical. Essa observação deu origem ao termo “paradoxal” para designar o sono REM, uma vez que era observado um padrão de ondas no EEG característico do estado de vigília enquanto observava-se completo relaxamento dos músculos, característica classicamente atribuída ao sono (JOUVET; MICHEL, 1959; JOUVET, 1965).

Em relação ao estudo do sono em ratos, importantes trabalhos surgiram a partir da década de 60, sendo encontrado no EEG um padrão de ondas semelhante ao observado em gatos e humanos (MICHEL *et al.*, 1961; ROLDÁN; WEISS, 1962).

Timo-laria e colaboradores realizaram, em 1970, uma detalhada descrição a respeito dos estágios do sono em ratos, observando a presença do sono sincronizado e dessincronizado, sugerindo que esses estágios eram compostos por diferentes etapas.

### 1.3 CLASSIFICAÇÃO DO SONO

Devido ao crescente interesse pela classificação e caracterização dos diferentes padrões de ondas observados no EEG, tornou-se necessária a padronização das análises dos registros de sono. Após vários encontros entre diversos pesquisadores, foi proposto um manual no intuito de facilitar e padronizar as análises realizadas por diferentes grupos de pesquisa (RECHTSCHAFFEN; KALES, 1968). Posteriormente, viu-se necessária a elaboração de um novo manual, organizado pela Academia Americana de Medicina do Sono (*American Academy of Sleep Medicine – AASM*), em 2007, devido aos avanços nas pesquisas da área e descobertas de doenças associadas ao sono (IBER *et al.*, 2007).

Dessa forma, o sono é dividido em estágios de acordo com o padrão de ondas observado no EEG e com a presença ou ausência do tônus muscular. Além disso, outras variáveis fisiológicas são utilizadas para o estagiamento do sono, como a presença dos movimentos oculares rápidos (REM) e o padrão cardiorrespiratório (ASERINSKY; KLEITMAN, 1953; DEMENT; KLEITMAN, 1957a; IBER *et al.*, 2007).

A vigília é caracterizada, predominantemente, pela presença de ondas alfa ( $\alpha$ ), com frequência variando em torno de 8-13 Hertz (Hz) no EEG. No eletromiograma (EMG) é possível observar a presença de tônus muscular (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007).

Em humanos, o sono pode ser dividido em dois estágios principais: sono não-REM e sono REM. O sono não-REM é ainda dividido em três estágios: N1 (estágio 1 do sono não-REM), N2 (estágio 2 do sono não-REM) e N3 (estágio 3 do sono não-REM) (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007; DATTA, 2010).

O estágio N1 é caracterizado por ondas de baixa amplitude e frequência variável, em torno de 2-7 Hz. Outras características podem estar presentes durante esse estágio, como a presença de ondas com duração máxima de 0,5 segundos. Ainda nesse estágio, pode-se observar o movimento lento dos olhos e o tônus

muscular variável, geralmente menor quando comparado à vigília (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007; DATTA, 2010).

O estágio N2 também é caracterizado por ondas de baixa amplitude e frequência variável, porém com a presença dos fusos do sono, classificados como uma sequência de ondas distintas de alta frequência (13-14 Hz) e duração  $\geq 0,55$  segundos. Ainda nesse estágio, pode-se observar o complexo K (caracterizado por uma onda negativa seguida imediatamente de uma onda positiva) (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007; DATTA, 2010).

O estágio N3 é também conhecido como sono de ondas lentas, caracterizado pela presença de ondas de baixa frequência (0,5-2 Hz) e amplitude que ultrapassa os 75 mV. Geralmente nesse estágio, não é observado o movimento dos olhos e o tônus muscular é menor quando comparado ao estágio N2, sendo variável (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007; DATTA, 2010).

Durante o sono REM, observa-se, predominantemente, a presença de ondas de alta frequência e baixa voltagem no EEG, o aumento na frequência respiratória e grande perda do tônus muscular. Além disso, são observados os movimentos oculares rápidos. Outras características fisiológicas podem ser observadas durante o sono REM, como a presença das ondas teta hipocámpais bem como das ondas de mesma frequência provenientes de regiões da ponte, núcleo geniculado lateral e córtex occipital, chamadas PGO (DATTA; MACLEAN, 2007; IBER *et al.*, 2007).

Nos demais animais, existem algumas diferenças em relação aos estágios de sono encontrados a partir da análise do EEG. Em *Drosophila melanogaster*, por exemplo, tem-se demonstrado a presença de um sono também heterogêneo, mas sem a presença das ondas delta de baixa frequência (NITZ *et al.*, 2002; VAN ALPHEN *et al.*, 2013). Em ursos, podem existir cinco estágios de sono: sono de ondas lentas de baixa voltagem bilateral, sono de ondas lentas de alta voltagem bilateral, sono de ondas lentas assimétrico esquerdo, sono de ondas lentas assimétrico direito e sono REM bilateral (LYAMIN *et al.*, 2008). Em ratos, gatos e camundongos, o sono não-REM é caracterizado por apenas dois estágios, sendo ambos classificados como sono de ondas lentas. O estágio I caracteriza-se pela presença de fusos do sono e o estágio II por ondas de baixa frequência (0,1 – 4 Hz) e alta amplitude (DATTA; MACLEAN, 2007).

Humanos e primatas não humanos apresentam o período de sono contínuo, geralmente durante a noite, e são designados como monofásicos. Outros animais, como ratos, gatos e camundongos são polifásicos, apresentando períodos de sono curtos alternados com períodos de vigília tanto durante a noite quanto durante o dia. Sabe-se que ocorrem cerca de 6-8 ciclos por noite, com duração de aproximadamente 90 minutos em humanos e 15 minutos em ratos, sendo que os primeiros ciclos podem não conter todos os estágios do sono (TIMO-IARIA *et al.*, 1970; DATTA; MACLEAN, 2007). A passagem de um estágio de sono para o estágio seguinte nem sempre ocorre, podendo ocorrer a passagem para o estágio anterior. No entanto, à medida que o sono se aprofunda, essa passagem no sentido retrógrado torna-se mais improvável. Por isso, grande parte dos primeiros ciclos é composta por sono de ondas lentas, enquanto que nos últimos ciclos ocorre a predominância do sono REM (ANDERSEN *et al.*, 2001; DATTA; MACLEAN, 2007).

## 1.4 REGULAÇÃO DO SONO

### 1.4.1 Influência do ritmo circadiano

Observa-se uma ritmicidade circadiana nos animais a nível comportamental, celular e molecular. Obviamente, o sono e a vigília também sofrem influência de um ritmo. Na maioria dos mamíferos, por exemplo, a vigília é predominante durante o período de luz, quando a possibilidade de encontrar nutrientes é superior ao risco de predação, e o período de sono é predominante durante a noite (SAPER; SCAMMELL; LU, 2005; MOORE, 2007).

Em 1916, por meio de estudos em indivíduos com encefalite letárgica, foi possível que o neurologista von Economo observasse as possíveis regiões do encéfalo responsáveis pela manutenção da ritmicidade do ciclo vigília-sono (VON ECONOMO, 1930). Atualmente, sabe-se que o principal temporizador do sistema nervoso central e responsável por essa ritmicidade é o núcleo supraquiasmático (SCN), presente no hipotálamo, logo acima do quiasma óptico. Estudos que analisam os efeitos de lesões nessa estrutura demonstram uma perda significativa dos ritmos circadianos (RICHTER, 1960; MISTLBERGER, 2005).

No entanto, sabe-se que a ritmicidade é modulada por alguns fatores como a produção de melatonina pela glândula pineal, durante o ciclo escuro e pela presença de luz, durante o ciclo claro. A luz é percebida por células ganglionares especializadas, presentes na retina, que contém o fotopigmento melanopsina. Esses sinais percebidos por essas células são transmitidos, via trato retino-hipotalâmico, da retina ao SCN, o qual possui projeções para diversas áreas envolvidas na regulação do estado de vigília e sono (BERSON, 2003; MOORE, 2007).

Nos últimos anos, tem-se dado maior atenção às moléculas envolvidas na geração e manutenção da ritmicidade. Sabe-se que algumas moléculas são expressas em um ritmo, como os fatores de transcrição conhecidos como BMAL1 e CLOCK, codificados pelos genes *bmal1* e *clock*, respectivamente. Quando ocorre acúmulo desses fatores de transcrição no citoplasma, formam-se dímeros que atuam no núcleo da célula, ativando a transcrição dos genes-relógio *Period (Per)* e *Cryptochrome (Cry)*, que dão origem às proteínas PER e CRY, respectivamente. Essas proteínas também formam dímeros que atuam de forma a inibir a atividade do complexo transcricional formado por BMAL1 e CLOCK, criando uma alça de *feedback* negativo. Existem outras alças que controlam a expressão dessas proteínas e fatores de transcrição. Apesar dessas observações, ainda não se sabe como esse relógio molecular proporciona a ritmicidade fisiológica e comportamental observada. No entanto, é proposto que uma célula no SCN influencie a ritmicidade das demais ao seu redor, gerando um ritmo mais estável e robusto para a estrutura como um todo (MOHAWK; TAKAHASHI, 2011).

Dessa forma, o ciclo vigília-sono está sob constante influência da interação entre o SCN e outros fatores como a presença de melatonina e a presença da luz, além da influência exercida pelas proteínas codificadas pelos genes-relógio.

#### 1.4.2 Regulação da vigília

Para que seja possível entender os mecanismos envolvidos na regulação do sono é necessário, primeiramente, compreender quais estruturas estão envolvidas na manutenção da vigília, bem como os sistemas de neurotransmissão associados a essa fase do ciclo vigília-sono.

Os primeiros estudos a respeito da regulação da vigília surgiram ao final da década de 40, quando foi evidenciado que, por estimulação de certas regiões do tronco encefálico, era possível observar uma dessincronização e ativação do EEG. Essa dessincronização era proveniente de uma substituição das ondas de alta amplitude e baixa frequência por ondas de baixa amplitude e alta frequência, características da vigília. Além disso, nesse período, foi feita a primeira inferência a respeito do sistema de ativação reticular ascendente (ARAS). A partir disso, diversas estruturas e sistemas de neurotransmissão foram apontados como envolvidos nesse complexo sistema de regulação, no qual cada componente contribui de formas específicas para a manutenção da vigília (MORUZZI; MAGOUN, 1949; MORUZZI, 1972).

O ARAS, responsável pela ativação cortical observada durante a vigília, pode ser analisado com base nas suas porções constituintes principais: 1) projeções colinérgicas a partir do PPT e tegmento látero-dorsal (LDT) para o tálamo e, por meio do trato tálamo-cortical, para o córtex (dorsalmente) e para o prosencéfalo basal (ventralmente), de onde os sinais de dessincronização são transmitidos ao córtex; 2) projeções monoaminérgicas para o hipotálamo lateral, prosencéfalo basal e, finalmente, para o córtex (LU; ZEE, 2010; BROWN *et al.*, 2012).

Assim, dentre as estruturas e sistemas de neurotransmissão envolvidos na manutenção e regulação da vigília, podem ser citados: neurônios colinérgicos do PPT e LDT (DATTA; PATTERSON; SPOLEY, 2001); neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe (DRN) (MONTI, 2010); neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC) (CHU; BLOOM, 1973); neurônios histaminérgicos do núcleo túbero-mamilar (TMN) (LIN; SERGEEVA; HAAS, 2011); neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc) e área tegmentar ventral (VTA) (MONTI, 1982); neurônios glutamatérgicos do mesencéfalo (ROPERT; STERIADE, 1981; DATTA; MACLEAN, 2007); e neurônios orexinérgicos/hipocretinérgicos da área hipotalâmica lateral (LHA) (TSUNEMATSU *et al.*, 2013).

#### 1.4.3 Regulação do Sono não-REM

Diversas hipóteses propõem-se a explicar como se dá a iniciação e manutenção do sono não-REM. Alguns estudos realizaram relevantes contribuições

nesse aspecto, com hipóteses contraditórias ou que, algumas vezes, complementam-se (SAPER; SCAMMELL; LU, 2005; DATTA; MACLEAN, 2007).

Uma importante área envolvida na regulação do sono não-REM é a área pré-óptica ventrolateral (vlPOA). Essa área, junto à área pré-óptica medial (mPOA), está presente na região anterior do hipotálamo, composta por grupos de neurônios que promovem o sono, enquanto a região posterior do hipotálamo possui grupos de neurônios que promovem a vigília (VON ECONOMO, 1930; DEURVEILHER; SEMBA, 2003).

Estudos já demonstraram que os neurônios da vlPOA possuem alta atividade durante o sono não-REM, além de receberem projeções GABAérgicas de núcleos como o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), o qual recebe aferências do SCN (ASTON-JONES *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2001; CHOU *et al.*, 2002; CHOU *et al.*, 2003). Além disso, sabe-se que a vlPOA possui projeções GABAérgicas inibitórias para importantes centros reguladores da vigília, como o PPT e o LDT, além de projeções para a área periaquedutal, DRN, LC, TMN e LHA. Essas estruturas envolvidas com o controle e manutenção da vigília também apresentam projeções GABAérgicas inibitórias para a vlPOA, criando um sistema de inibição recíproco (SHERIN *et al.*, 1998; CHOU *et al.*, 2002; DEURVEILHER; SEMBA, 2003).

Observando esse sistema de inibição recíproco, foi proposta a hipótese conhecida como *Flip-flop*, devido à semelhança observada entre esse sistema de regulação e os circuitos que recebem essa designação na engenharia elétrica. De acordo com os autores que propuseram a hipótese, esse sistema pode ser assim denominado, pois existe uma interação na qual, quando um dos sítios está mais ativo, esse inibe o seu competidor e, conseqüentemente, desinibe sua própria atividade. Além disso, nesse sistema podem ser observadas mudanças de estado drásticas e abruptas, porém relativamente instáveis, como acontece com o sono e a vigília (SAPER; CHOU; SCAMMELL, 2001; SAPER; SCAMMELL; LU, 2005).

Além dessa influência do ritmo circadiano na iniciação do sono não-REM, proporcionada por aferências a partir do SCN para estruturas que se projetam para a vlPOA, estudos demonstram outras situações capazes de promover o sono não-REM.

A “teoria da homeostase metabólica” explica que a passagem do estado de vigília para o sono não-REM se dá devido a um acúmulo de metabólitos. Esse

acúmulo se dá principalmente devido a uma atividade neuronal aumentada, característica da vigília. Com o decorrer do tempo, devido à atividade metabólica alta e consequente síntese de metabólitos a um nível crítico, ocorre uma inibição dos sistemas responsáveis pela manutenção da vigília, o que dá início ao sono. Com esse estado, ocorre uma diminuição da atividade neuronal, havendo uma redução da atividade metabólica e consequentemente do nível de metabólitos até uma faixa basal. Assim, ocorre uma desinibição dos sistemas promotores da vigília (DATTA; MACLEAN, 2007). Diversos metabólitos são apontados como contribuintes para essa transição de um estado a outro como a adenosina, o óxido nítrico, a glicina, as prostaglandinas e as citocinas (URADE; HAYAISHI, 2011; KOSTIN *et al.*, 2012; WESCHENFELDER *et al.*, 2012).

Sabe-se que existem receptores nos quais esses fatores homeostáticos do sono podem atuar, como a adenosina, por exemplo. A adenosina possui receptores próximos ou adjacentes à VLPOA e estudos que promoveram a infusão de adenosina ou de um agonista, observaram uma sonolência nos animais, indicando uma interação desses fatores homeostáticos e áreas influenciadas pelo ritmo circadiano para a geração e manutenção do sono (HU *et al.*, 2013; SHETH *et al.*, 2014).

#### 1.4.4 Regulação do sono REM

Existem diversos modelos com o objetivo de explicar os mecanismos regulatórios envolvidos com a iniciação e manutenção do sono REM. Esses modelos podem apresentar ideias opostas, como também servir como complemento para um modelo pré-existente. As teorias a respeito da regulação do sono REM concentram-se principalmente na hipótese colinérgica. Essa hipótese propõe que a iniciação e manutenção do sono REM é controlada pelos neurônios colinérgicos presentes na ponte, mais especificamente os neurônios do PPT e LDT (ASERINSKY; KLEITMAN, 1953; MCCARLEY, 2004; DUNMYRE; MASHOUR; BOOTH, 2014).

A partir dessa hipótese, foi proposto o modelo das interações recíprocas. Esse modelo propunha uma interação recíproca entre os neurônios noradrenérgicos do LC, promotores da vigília, e os neurônios colinérgicos do campo tegmental gigante-celular (CTG) (MCCARLEY; HOBSON, 1975; HOBSON; MCCARLEY; WYZINSKI, 1975). Posteriormente, esse modelo foi modificado e a proposta é que



exista uma interação recíproca entre os neurônios colinérgicos do LDT/PPT e os neurônios promotores da vigília. Assim, durante a vigília, os neurônios aminérgicos (principalmente serotoninérgicos e noradrenérgicos) estão ativados e inibem os neurônios colinérgicos do LDT/PPT. Assim que se inicia o sono não-REM, a atividade desses neurônios aminérgicos diminui e, conseqüentemente, a inibição exercida por esses fica também diminuída, ocorrendo um aumento da atividade dos neurônios colinérgicos, ativando os geradores de sinais do sono REM (os quais serão descritos abaixo), conseqüentemente promovendo o sono REM. Os neurônios colinérgicos do PPT/LDT possuem projeções excitatórias para os neurônios aminérgicos. Assim, quando ativados, estimulam os neurônios aminérgicos, responsáveis pela vigília, o que proporciona a mudança de fase do sono REM para a vigília (MCCARLEY; HOBSON, 1975; HOBSON; MCCARLEY; WYZINSKI, 1975; BROWN *et al.*, 2012).

Além desse modelo, foram propostos outros mais sofisticados, como o modelo chamado de interação recíproca limitado pelo ciclo (do inglês, *limit cycle model*). Esse modelo considera a influência do ritmo circadiano sobre as transições entre um estado de sono e outro (MCCARLEY; MASSAQUOI, 1986; MCCARLEY; MASSAQUOI, 1992; REMPE; BEST; TERMAN, 2010). Assim, além das diferentes estruturas do tronco encefálico e diferentes sistemas de neurotransmissão envolvidos na regulação do sono REM, existiria também uma participação de núcleos presentes no prosencéfalo. Existem evidências de que uma dessas áreas seja a LHA, com uma grande densidade de neurônios orexinérgicos. Esses neurônios disparam apenas durante o dia, apresentando projeções para núcleos importantes na promoção da vigília, como o LC, NDR e neurônios GABAérgicos REM-off (discutidos em seguida). Além disso, a ausência desses neurotransmissores é associada à narcolepsia, uma doença caracterizada por sonolência diurna excessiva (PASSOUANT *et al.*, 1969; BROWN *et al.*, 2001; LEE; HASSANI; JONES, 2005; KANTOR *et al.*, 2009). Outra área diretamente associada ao ritmo circadiano e que parece ser muito importante na promoção do sono REM é a VLPOA. Estudos demonstram que uma lesão nessa área é capaz de diminuir a quantidade de sono REM de forma significativa (LU *et al.*, 2000).

Recentemente, os estudos têm atribuído uma importância maior à neurotransmissão glutamatérgica e à neurotransmissão GABAérgica na regulação

do sono REM. O modelo conhecido como “*flip-flop switch*” propõe que a interação recíproca entre neurônios GABAérgicos REM-on (presentes no núcleo sublaterodorsal - SLD) e neurônios GABAérgicos REM-off (presentes na área cinzenta periaquedutal ventrolateral - vIPAG e tegmento pontino lateral - LPT) é de caráter inibitório e seria o principal mecanismo proporcionando a mudança de estado entre o sono REM e sono não-REM. Nesse modelo, os neurônios colinérgicos e aminérgicos seriam apenas moduladores dessa transição, uma vez que lesões nessas regiões não demonstram uma alteração significativa no sono REM (LU *et al.*, 2006). Outros núcleos têm sido apontados como participantes dessa regulação como o núcleo reticular paragigantocelular dorsal (DPGi), com predominância de neurônios GABAérgicos. Esse atuaria inibindo centros aminérgicos (LC e NDR), além de centros GABAérgicos REM-off (LUPPI *et al.*, 2007; GOUTAGNY *et al.*, 2008). Tendo em vista essa divergência de evidências a respeito da regulação do sono REM, alguns pesquisadores propõem uma associação entre o modelo da interação recíproca e a influência GABAérgica (MCCARLEY, 2004; BROWN *et al.*, 2012).

Outro modelo construído com base nas proposições do modelo da interação recíproca discute a regulação do sono REM a partir de uma diferente perspectiva. O modelo denominado de “rede celular-molecular” propõe que eventos característicos do sono REM são gerados por grupos de células distintas distribuídas pelo tronco encefálico. Dessa maneira, não existe um “centro” gerador das características associadas ao sono REM, apenas um centro iniciador que seriam os neurônios colinérgicos do PPT/LDT. Assim, diferentes sistemas de neurotransmissão podem estar modulando cada um desses sinais observados durante o sono REM (VERTES, 1984; DATTA; MACLEAN, 2007).

Para a ativação cortical observada no EEG durante o sono REM, ocorre um aumento dos disparos dos neurônios glutamatérgicos da formação reticular mesencefálica (MRF) e da formação reticular medular (MN), resultando em uma estimulação da via tálamo-cortical que, por sua vez, ativa o córtex (STERIADE; SAKAI; JOUVET, 1984; DATTA; MACLEAN, 2007).

A região responsável pela atonia muscular que ocorre durante o sono REM, localizada no LC, foi designada como peri-LC-alfa em gatos e como núcleo sublaterodorsal (SLD) em ratos e sabe-se que os neurônios que compõe essas

regiões são neurônios glutamatérgicos. Esses neurônios possuem projeções para os neurônios glicinérgicos na medula espinhal, os quais inibem os motoneurônios espinhais durante o sono REM. Além disso, acredita-se que neurônios glutamatérgicos, noradrenérgicos do LC e serotoninérgicos do DRN promovam a ativação dos motoneurônios durante a vigília e que, com a diminuição da atividade desses neurônios durante o sono REM, essa ativação diminua (SAKAI, 1980; LU *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2012).

Em relação ao movimento rápido dos olhos, uma das características mais marcantes do sono REM, foi observada uma região muito importante para a ocorrência desses sinais, localizada em uma área restrita da ponte dorsomedial, rostral ao núcleo abducens, chamada de área peri-abducente (GOTTESMANN, 1997; DATTA; MACLEAN, 2007).

Outras características importantes que estão presentes durante o sono REM também são reguladas por diferentes sistemas de neurotransmissão como as ondas de ritmo teta hipocampais. Acredita-se que a ativação tônica de neurônios da formação reticular, oriundas principalmente de células no núcleo reticular pontino oral (PnO), excita o núcleo supramamilar (SUM) por meio de projeções glutamatérgicas. Essa ativação tônica é convertida em disparos rítmicos no SUM que, por meio de projeções glutamatérgicas, excita neurônios GABAérgicos e colinérgicos no septo medial e na banda diagonal de Broca, que ditam a ritmicidade das ondas teta hipocampais (VERTES, 1980; BROWN *et al.*, 2012; PIGNATELLI; BEYELER; LEINEKUGEL, 2012).

As ondas chamadas de PGO são ondas de potenciais elétricos sincronizados entre a ponte, o núcleo geniculado lateral e o córtex occipital. Acredita-se que para o componente tálamo-cortical das ondas PGO haja uma influência de neurônios colinérgicos a partir do PPT/LDT e uma influência do SLD/área para-braquial para o componente pontino (SANFORD *et al.*, 1994; DATTA, 1997; DATTA; MACLEAN, 2007).

#### 1.4.4.1 PPT na iniciação e na manutenção do sono REM

Estudos demonstram que o PPT possui diversos tipos de populações neuronais, dentre essas existem os neurônios chamados de REM-on, que

aumentam as suas taxas de disparo com a passagem do estado de vigília para o sono não-REM e fazem isso de forma mais acentuada ainda com a passagem do sono não-REM para o sono REM. Além desses neurônios chamados de REM-*on*, existem os neurônios chamados de *wake-REM-on*, que possuem uma maior frequência de disparo durante a vigília e durante o sono REM (DATTA *et al.*, 1989; STERIADE *et al.*, 1990). Sabe-se que a presença do sono REM é dependente do nível de atividade dessas células colinérgicas presentes no PPT. Os neurônios REM-*on* e *wake-REM-on*, presentes na porção colinérgica do PPT, possuem receptores glutamatérgicos e receptores GABAérgicos (DATTA; SIWEK, 2002).

Trabalhos apontam que durante o sono não-REM existe uma inibição promovida pela ligação do GABA aos receptores GABA-B. Esses receptores ativados inibem a adenilato ciclase por meio de uma proteína Gi, diminuindo a adenosina 3', 5'-cíclica monofosfato (cAMP) e também a ativação da proteína quinase A (PKA). Quando o glutamato liga-se a seus receptores do tipo cainato, ele promove uma ativação das células colinérgicas que atingem 65% do seu potencial. Molecularmente, ocorre a ativação de canais iônicos com a entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  na célula. Este íon, por sua vez, ativa a adenilato ciclase, responsável pelo aumento na síntese de cAMP, levando a ativação da PKA. Essa proteína fosforila várias proteínas intracelulares, proporcionando a ativação de canais iônicos, aumentando a expressão de receptores, aumentando a atividade neuronal, promovendo a síntese e liberação de neurotransmissores, dentre outros fatores que contribuem para promover o sono REM. Quando os receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) também são ativados, se atinge uma atividade igual a 100% das células colinérgicas do PPT, e conseqüentemente, é observada a ocorrência da vigília (DATTA; PATTERSON; SIWEK, 1997; DATTA; PATTERSON; SPOLEY, 2001; DATTA, 2002; ULLOOR *et al.*, 2004; DATTA; MACLEAN, 2007).

#### 1.4.4.2 Sistema dopaminérgico na regulação do sono REM

O sistema dopaminérgico é um sistema de neurotransmissão classicamente associado ao estado de vigília (LU; ZEE, 2010). Os estudos delineados para a observação da influência do sistema dopaminérgico na regulação do sono baseiam-se em manipulações genéticas, farmacológicas ou por meio de lesões realizadas em

estruturas com grande densidade de neurônios dopaminérgicos (MONTI; JANTOS, 2008; LALOUX *et al.*, 2008).

A associação entre o sistema dopaminérgico e o sono foi verificada por volta da década de 80, quando se observou que a privação de sono REM era capaz de induzir uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos (TUFIK; LINDSEY; CARLINI, 1978). Posteriormente, outros trabalhos corroboraram um envolvimento entre o sistema dopaminérgico e o sono (TUFIK, 1981; TUFIK *et al.*, 1987).

Estruturalmente, observa-se uma grande interação entre as principais áreas ricas em neurônios dopaminérgicos como a SNpc e a VTA e os núcleos envolvidos na regulação do sono. Estudos evidenciaram projeções dessas estruturas para o DRN, LC, LHA, PPT e LDT. Além disso, essas estruturas dopaminérgicas também recebem projeções de diversas estruturas relacionadas à regulação do sono (MONTI; MONTI, 2007).

Na doença de Parkinson ocorre uma perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e observam-se alguns sintomas relacionados ao sono como o distúrbio comportamental do sono REM (RBD, do inglês *REM sleep behavioral disorder*), a síndrome das pernas inquietas (RLS, do inglês *restless legs syndrome*), além de uma intensa fragmentação de sono e uma sonolência diurna excessiva (LANG; LOZANO, 1998; LANE; DUNNETT, 2008; LIMA *et al.*, 2012). Contrariamente, quando ocorre um aumento na neurotransmissão dopaminérgica, observado em indivíduos esquizofrênicos, por exemplo, também são observadas alterações relacionadas ao sono (GUÉNOLÉ *et al.*, 2014). Essa associação entre desequilíbrio dopaminérgico e alterações no sono sugere um envolvimento dopaminérgico na regulação do sono.

Além disso, apesar de alguns estudos não terem observado uma mudança significativa na média da frequência dos disparos de neurônios dopaminérgicos ao longo do ciclo vigília-sono, outros observaram exatamente o oposto e, ainda, uma maior liberação de dopamina durante o sono REM (MILLER *et al.*, 1983; LENA *et al.*, 2005; DAHAN *et al.*, 2007).

Alguns estudos têm o objetivo de observar a influência dopaminérgica na regulação do sono por meio da administração de drogas que atuam lesionando neurônios dopaminérgicos. Essa administração pode ser realizada de maneira sistêmica ou especificamente nas estruturas de interesse. Barraud e colaboradores

(2009) fizeram a administração sistêmica da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em macacos, que é caracterizada por causar a morte de neurônios dopaminérgicos, e observaram uma alteração drástica na arquitetura do sono, resultando em uma diminuição da eficiência do sono que persistiu por anos após a administração da droga. Essa mudança da arquitetura do sono foi concomitante com um colapso na homeostase dopaminérgica (BARRAUD *et al.*, 2009).

Em outro estudo, foi realizada a administração de MPTP diretamente na SNpc e foi observada uma supressão do sono REM, indicando uma grande participação dos neurônios dopaminérgicos da SNpc na regulação do sono, principalmente na promoção do sono REM (LIMA *et al.*, 2007). A influência do sistema dopaminérgico sobre a regulação do sono também foi observada em outros modelos da doença de Parkinson, como no modelo induzido pela infusão da 6-hidroxidopamina (6-OHDA), promovendo uma alteração na atividade das ondas teta no EEG (SEI *et al.*, 1999).

A manipulação farmacológica nesse contexto se dá principalmente por meio da infusão de drogas que atuam nos receptores dopaminérgicos. Existem duas grandes famílias bem conhecidas de receptores dopaminérgicos: família D<sub>1</sub> e família D<sub>2</sub>. A família D<sub>1</sub> engloba os receptores do tipo D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub>, considerados como receptores acoplados a proteínas Gs e que, quando ativados, ativam a enzima adenilato ciclase. São receptores pós-sinápticos excitatórios. A família D<sub>2</sub> engloba os receptores do tipo D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Esses receptores acoplados a proteína Gi, quando ativados, inibem a adenilato ciclase, podendo agir como autorreceptores ou receptores pós-sinápticos inibitórios (MONTI; MONTI, 2007).

Muitos estudos demonstram um envolvimento dopaminérgico na regulação do sono por meio da modulação dos receptores. Em relação à modulação do receptor D<sub>1</sub>, estudos demonstram que a administração de um agonista desse receptor contribui para um aumento da vigília enquanto que a administração de um antagonista possui efeito contrário (EDER; ZDRAVKOVIC; WILDSCHIODTZ, 2003; HYACINTHE *et al.*, 2014). Em relação ao receptor D<sub>2</sub>, Lima e colaboradores observaram que a injeção intraperitonal de haloperidol, um antagonista para esse receptor, foi capaz de diminuir drasticamente a porcentagem de sono REM durante o período rebote, após privação de sono de 96 horas. No entanto, a administração de

piribedil, um agonista do mesmo receptor, não foi capaz de alterar a porcentagem de tempo do animal em sono REM (LIMA *et al.*, 2008). Em relação ao uso do raclopride, os resultados são contraditórios. Por meio do bloqueio de receptores dopaminérgicos mediado pela administração intraperitoneal de raclopride foi observado um aumento na porcentagem de sono REM (QU *et al.*, 2010). Contrariamente, em um estudo com administração subcutânea da droga não foi observada alteração no ciclo vigília-sono.

Muitos trabalhos também avaliam os efeitos da administração de agonistas dopaminérgicos não-seletivos ou seletivos para receptores D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> na regulação do sono (ONGINI; CAPORALI, 1987; KROPF; KUSCHINSKY, 1993; LAGOS *et al.*, 1998). Em Lagos e colaboradores (1998), observou-se que a administração subcutânea de uma dose baixa (30 µg/Kg) do pramipexole, um agonista dopaminérgico específico para receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, (principalmente D<sub>3</sub>, assim como o piribedil) foi capaz de produzir um aumento no sono de ondas lentas e sono REM, enquanto que em altas doses (500 µg/Kg) foi observado um efeito contrário. Esse é geralmente um perfil apresentado por agonistas de receptores D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>.

Dzirasa e colaboradores (2006) realizaram um experimento em que os animais tinham seus níveis dopaminérgicos manipulados geneticamente e farmacologicamente. Esses autores observaram que, ao expor camundongos a uma ativação dopaminérgica elevada, os animais apresentavam um novo padrão de ondas hipocâmpais durante a vigília que se assemelhava ao padrão eletrofisiológico encontrado durante o sono REM. Quando esses animais recebiam um antagonista dopaminérgico D<sub>2</sub>, esse padrão anormal desaparecia. Contrariamente, animais expostos a uma depleção dopaminérgica (induzida pelo nocaute do transportador dopaminérgico concomitante ao tratamento com α-metil-tirosina) exibiam um padrão de ondas hipocâmpais durante a vigília que se assemelhava ao padrão de ondas encontrado durante o sono não-REM. Ainda, esses animais apresentaram uma supressão aparente do sono não-REM e uma supressão completa do sono REM. No entanto, quando os animais eram tratados com agonista D<sub>2</sub>, o sono REM era recuperado (DZIRASA *et al.*, 2006).

Ainda, utilizando camundongos nocaute para o receptor D<sub>2</sub>, pesquisadores observaram uma diminuição no tempo de vigília desses animais em comparação ao grupo selvagem. Além disso, esses animais passavam maior quantidade de tempo

em sono não-REM e sono REM quando comparados a animais do grupo selvagem. Quando realizada a administração de um antagonista seletivo para o receptor D<sub>2</sub> (raclopride) nos animais do grupo selvagem, verificou-se um efeito semelhante ao observado nos animais nocaute (QU *et al.*, 2010).

#### 1.4.4.3 SNpc como um centro efector do sono REM

Alguns pesquisadores acreditam que existam vários efetores do sono REM (geradores de sinais do sono REM) que são ativados pela liberação colinérgica promovida pelo PPT, como descrito anteriormente (DATTA; MACLEAN, 2007). No entanto, alguns trabalhos apontam a PRF como o centro efector mais importante para a geração do sono REM, ideia reforçada pela grande interação anatômica entre o PPT e a PRF (MCCARLEY; HOBSON, 1975; MCCARLEY, 2004).

Acredita-se que o sono REM seja iniciado pela ativação das células colinérgicas do PPT devido à ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo cainato. Isso leva a uma liberação de acetilcolina nos geradores de sinais do sono REM bem como nas células da PRF, ativando-as. Essa ativação permite que a PRF libere glutamato nas células colinérgicas do PPT, mantendo-as ativas e permitindo que essas continuem liberando acetilcolina nos geradores de sinais do sono REM e também na PRF, criando uma alça de *feedback* positivo (QUATTROCHI *et al.*, 1989; STEININGER *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1995; DATTA; MACLEAN, 2007).

No entanto, trabalhos apontam que, assim como ocorre entre o PPT e a PRF, o PPT e a SNpc possuem semelhanças anatômicas conservadas evolutivamente. As semelhanças no padrão de aferências e eferências são evidentes, além de ambas as estruturas possuírem uma grande conectividade entre si. Alguns autores propõem ainda que talvez os núcleos da base e o PPT devam ser considerados partes integrantes de uma mesma circuitaria (MENA-SEGOVIA *et al.*, 2004).

Forster e Blaha (2003) demonstraram que a liberação de acetilcolina e glutamato pelo PPT é capaz de ativar as células dopaminérgicas nigroestriatais. Assim, o aumento dos disparos dos neurônios dopaminérgicos da VTA e SNpc observado durante o sono REM pode ser decorrente de uma ativação promovida pelo PPT (FORSTER; BLAHA, 2003; LIMA, 2013).





Essa relação entre sono e memória é de extrema relevância, corroborada por teorias que propõem que a consolidação de memória seja a principal função do sono, defendendo que esse papel tenha sido conservado evolutivamente por proporcionar uma grande vantagem adaptativa para os animais (HERNANDEZ; ABEL, 2011).

De forma geral, os estudos relacionam o sono REM a diferentes tipos de memórias (GROCH *et al.*, 2013; MENZ *et al.*, 2013). Em um estudo, pessoas foram randomicamente distribuídas em grupos que seriam submetidos a tarefas que envolviam diferentes tipos de aprendizado. Após isso, foi realizado o registro de sono e observou-se que existia um aumento na quantidade de fusos ou das ondas teta hipocampais dependendo do tipo de aprendizado ao qual os indivíduos foram submetidos durante o dia (FOGEL; SMITH; COTE, 2007). Outro estudo também obteve resultado semelhante, evidenciando que existe uma relação entre a atividade dos fusos durante o sono não-REM e uma experiência de aprendizado anterior (GAIS *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos tentam avaliar a influência do sono na memória por métodos de privação de sono, avaliando a consequência da ausência do sono. Ao realizarem privação de sono total em camundongos por apenas 8 horas antes de realizar um teste de memória espacial, pesquisadores observaram um prejuízo cognitivo. Quando essa privação foi realizada antes do treino isso não aconteceu, promovendo um desempenho, na tarefa, semelhante ao do grupo controle (RAHMAN *et al.*, 2013). Outros estudos utilizaram o método da plataforma única para privar animais de sono REM por um período de 24 horas e observaram que essa privação foi capaz de gerar um prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos, o qual mimetiza uma memória declarativa (DOS SANTOS *et al.*, 2013; PROENÇA *et al.*, 2014).

Os primeiros trabalhos que analisaram a influência do sono na memória consideravam o sono como um processo passivo, sendo apenas um período em que as memórias poderiam ser consolidadas de forma mais eficaz, uma vez que a interferência de estímulos externos estaria diminuída (ELLENBOGEN *et al.*, 2006; RASCH; BORN, 2013).

Posteriormente, foi proposto um papel para o sono na organização das memórias, reforçando memórias importantes e apagando memórias desnecessárias.

Uma versão atualizada dessa ideia é a teoria da homeostase sináptica, proposta por Tononi e Cirelli. Essa teoria afirma que o sono de ondas lentas teria a função de diminuir as sinapses mais fracas, consideradas como produtos não funcionais provenientes de processos mais importantes ocorridos durante o período de vigília. Ao fazer essa diminuição, o sono de ondas lentas estaria fortalecendo as sinapses funcionais indiretamente (TONONI; CIRELLI, 2003; TONONI; CIRELLI, 2006).

A teoria do processo de consolidação ativo propõe que é necessária uma reativação repetida das informações recém-adquiridas durante a vigília para que ocorra o processo de consolidação de uma memória de longa duração. Ainda, de acordo com essa teoria, durante o sono de ondas lentas, essa memória seria retirada de locais de armazenamento temporário e direcionada a locais de armazenamento definitivo, onde seria integrada a memórias de longa duração pré-existentes (BORN; WILHELM, 2012; RASCH; BORN, 2013).

Sabe-se que para a formação de memórias precisa-se de um mecanismo conhecido como potenciação de longa duração (LTP). Esse mecanismo consiste no aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetitiva de um axônio que faz sinapse com eles (IZQUIERDO, 2002). Como essa resposta pode durar horas, semanas ou meses, associou-se esse processo com o processo de consolidação de memórias.

Atualmente sabe-se que para a formação e consolidação das memórias relacionadas à região CA1 do hipocampo, por exemplo, é necessária uma excitação repetida de células hipocâmpais por meio da estimulação dos receptores de glutamato AMPA, NMDA bem como de seus receptores metabotrópicos. Isso propicia a intervenção sequencial de diversas vias metabólicas mediadas por proteínas quinases pré e pós-sinápticas (PKG, PKC, CaMKII, PKA e MAPKs) que ativam sucessivamente proteínas essenciais para a formação de memórias como o elemento de ligação responsivo ao cAMP (CREB). Disso, derivam as ativações de outros genes e síntese de proteínas necessárias para as alterações morfológicas associadas à constituição definitiva das memórias (MILNER *et al.*, 1998; IZQUIERDO, 2002).

Observa-se que o nível de moléculas importantes para a consolidação da memória como cAMP, a MAPK e CREB está aumentado durante o sono REM (LUO *et al.*, 2013). Além disso, estudos apontam um aumento na atividade de

fosfodiesterases em animais privados de sono, o que prejudicaria a via de sinalização cAMP-PKA-CREB, essencial na formação de LTP (VECSEY *et al.*, 2009; RASCH; BORN, 2013) .

Muitos sistemas de neurotransmissão envolvidos tanto na regulação da vigília quanto na regulação do sono também parecem estar envolvidos em processos de consolidação da memória. Foi demonstrado que altos níveis de acetilcolina são necessários para a consolidação de novas memórias durante o período de vigília e que baixos níveis desse mesmo neurotransmissor propiciam a consolidação de memórias durante o período de sono (HASSELMO; MCGAUGHY, 2004).

Em relação à dopamina, diversos estudos apontam um importante papel desse neurotransmissor na consolidação de diferentes tipos de memórias como na memória de trabalho (ECKART *et al.*, 2014), memória de procedimento (HOSP; LUFT, 2013), memórias associadas a comportamentos motivacionais ou de recompensa (BAUDONNAT *et al.*, 2013), dentre outros (PUIG; MILLER, 2014). Além disso, observa-se que indivíduos com a doença de Parkinson podem apresentar déficit cognitivo, apontando para uma possível relação entre a dopamina e sistemas de memória (CALABRESI *et al.*, 2013; ROBBINS; COOLS, 2014).

Dessa forma, sabendo que a dopamina está envolvida na regulação do sono, é esperado que a influência desse neurotransmissor na consolidação de memórias seja relevante, mesmo que indiretamente, por meio da promoção do sono REM que, como descrito anteriormente, está diretamente relacionado à consolidação de diversos tipos de memória. Assim, é de grande relevância observar o papel desse neurotransmissor sob uma condição normal ou dentro de um contexto de privação de sono, além de observar os efeitos da modulação de seus receptores.

## 2 JUSTIFICATIVA

O envolvimento do sistema dopaminérgico na regulação do sono foi negligenciado por muitos anos. Consequentemente, existe uma carência de informações a respeito do papel desse sistema de neurotransmissão na regulação do sono, quando comparado aos demais sistemas. Além disso, existem poucas evidências em modelos animais, no sentido de esclarecer como os mecanismos de regulação do sono, envolvendo o sistema dopaminérgico, se inter-relacionam. Ainda, os distúrbios de sono acometem cerca de 80% dos pacientes com a doença de Parkinson, os quais também apresentam déficits cognitivos, promovendo uma piora significativa na qualidade de vida desses pacientes. Dessa forma, é de grande relevância a compreensão das possíveis relações entre esse sistema de neurotransmissão e a regulação do sono.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o envolvimento recíproco do PPT e do sistema dopaminérgico na regulação do sono REM.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos promovidos pelo bloqueio (raclopride) ou ativação (piribedil) seletiva dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> associados a lesões do PPT sobre o desempenho motor utilizando o teste do campo aberto.
- Analisar os efeitos promovidos pelo bloqueio (raclopride) ou ativação (piribedil) seletiva dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> associados a lesões do PPT sobre o desempenho cognitivo utilizando o teste de reconhecimento de objetos.
- Investigar os efeitos eletrofisiológicos sobre o padrão do ciclo vigília-sono de animais submetidos à lesão bilateral do PPT com ácido ibotênico associada ao bloqueio (raclopride) ou ativação (piribedil) seletiva dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>.
- Quantificar através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) as alterações neuroquímicas na SNpc e no estriado dos grupos submetidos a lesões do PPT associadas ao bloqueio (raclopride) ou ativação (piribedil) seletiva dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes preconizadas pelo CEUA/BIO da Universidade Federal do Paraná (Protocolo aprovado n°. 655) que sustentam a aplicação de modernos princípios éticos em relação ao uso de animais de experimentação. Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando entre 280-330g. Os animais foram mantidos em uma sala com umidade e temperatura controladas ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), em um ciclo de claro-escuro de 12 h (7:00-19:00 h). Água e comida foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o experimento.

### 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na FIGURA 2 está representado o delineamento experimental (A) e a distribuição dos animais em diferentes grupos (B). Foi realizada a lesão no PPT no dia zero e 7 dias após a lesão, os animais foram submetidos a uma fase de treino no teste de reconhecimento de objetos (RDO). Logo em seguida, os animais foram privados de sono REM (PSREM) pelo método da plataforma única por um período de 24 horas. Assim que saíram da privação de sono, foi realizada a microinfusão de drogas no estriado e, após 30 minutos, os animais foram testados no RDO e no teste do campo aberto (CA) para avaliação do perfil motor. Em seguida, registros eletrofisiológicos foram realizados em um período de 24 horas de sono rebote (REB). Por fim, os animais foram perfundidos ou decapitados para a realização de experimentos de imuno-histoquímica (para a determinação da extensão das lesões) e quantificações neuroquímicas por HPLC (para determinação dos níveis de neurotransmissores na SNpc e no estriado), respectivamente.

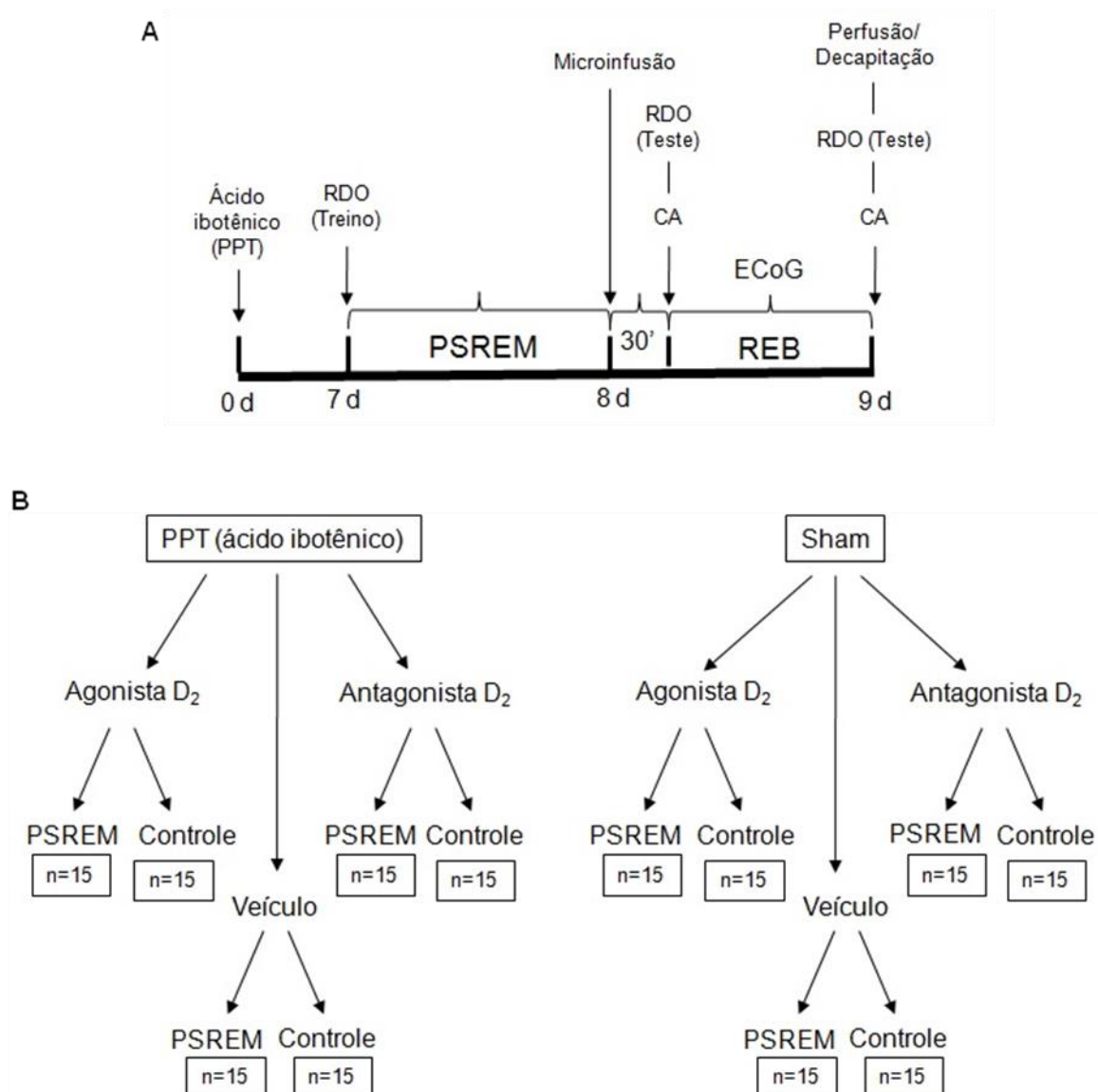


FIGURA 2. Representação esquemática do experimento (A) e da distribuição dos animais em diferentes grupos (B). O número total de animais foi de 180. Foram utilizados 10 animais/grupo para os testes comportamentais, 5 animais/grupo para as análises eletrofisiológicas, 5 animais/grupo para as análises por imuno-histoquímica e 10 animais/grupo para as análises neuroquímicas. PSREM, privação de sono REM; REB, período de sono rebote; RDO, teste de reconhecimento de objetos; CA, teste do campo aberto; ECoG, eletrocorticograma.

#### 4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram inicialmente sedados com xilasina aplicada intraperitonealmente (10 mg/kg) e, após a sedação inicial, foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg).



Para a infusão de ácido ibotênico no PPT as coordenadas foram (AP) = - 7,8 mm, (ML) =  $\pm$  2,0 mm e (DV) = - 7,4 mm (PAXINOS; WATSON, 2005). As infusões foram realizadas de acordo com o descrito em Alderson e colaboradores (2003). Infusões de 0,2  $\mu$ L de ácido ibotênico (0,12 M) em cada hemisfério foram realizadas com auxílio de uma bomba eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) e micro-seringa de 5  $\mu$ L (Hamilton Apparatus) em estágios de 0,01  $\mu$ L com 10 s de intervalo totalizando um tempo total de injeção de 200 segundos. A agulha injetora permaneceu no sítio de infusão por 5 minutos para evitar refluxo. Animais do grupo Sham foram injetados apenas com o veículo (tampão fosfato pH 7,4) em iguais condições.

Para os experimentos eletrofisiológicos de registro de sono foram implantados eletrodos. Para os dois primeiros eletrodos as coordenadas foram, a partir do bregma, (AP) = - 1,0 mm, (ML) = - 3,0 mm (primeiro eletrodo), (AP) = 3,0 mm, (ML) = 1,0 mm (segundo eletrodo). As coordenadas de fixação para os dois últimos eletrodos corticais foram determinadas a partir do lambda: (AP) = 1,0 mm, (ML) = - 4,0 mm (terceiro eletrodo) e (AP) = 4,0 mm, (ML) = 1,0 mm (quarto eletrodo) (PAXINOS; WATSON, 2005).

Para permitir a infusão intraestriatal das drogas (raclopride ou piribedil), foi realizado todo o processo de implantação das cânulas guia no estriado dorsal. As seguintes coordenadas foram utilizadas tendo como referência o bregma: (AP) = + 1,0 mm, (ML) =  $\pm$  3,0 mm e (DV) = - 6,0 mm (PAXINOS; WATSON, 2005).

#### 4.4 PRIVAÇÃO DE SONO REM (PSREM)

A PSREM foi realizada pelo método da plataforma única, em que cada animal é colocado em um tanque (23 x 23 x 35 cm) contendo uma plataforma cilíndrica de 6,5 cm de diâmetro, rodeada de água cerca de 1 cm abaixo da superfície. No início de cada episódio de sono REM, o animal sofre uma redução de tônus muscular e cai na água, sendo despertado. Com esse método observa-se que o sono REM é completamente abolido durante todo o período desejado, sendo o sono de ondas lentas menos afetado (MACHADO *et al.*, 2005). Ao longo do estudo, a sala experimental foi mantida em condições controladas (22  $\pm$  2 °C, 12 h ciclo claro/escuro, as luzes acesas às 7:00 h). O grupo controle foi mantido na mesma

sala que os ratos privados de sono durante o estudo. Alimentação e água foram fornecidas *ad libitum*.

#### 4.5 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS (RDO)

O aparato consiste em uma caixa aberta (profundidade x largura x altura = 80 cm x 80 cm x 50 cm) feita de madeira. O primeiro dia de teste consistiu na exposição do animal ao aparato por três vezes com duração de cinco minutos cada, havendo um tempo de 15 minutos entre uma exposição e outra. Nesse dia, o animal teve contato com dois objetos idênticos. No 2º dia, o animal foi exposto novamente ao aparato contendo os mesmos objetos do dia anterior, por cinco minutos. Após quinze minutos, o animal retornou ao aparato por três minutos, havendo um objeto familiar (o qual esteve presente nas exposições anteriores) e um objeto não familiar. No 3º dia de teste ocorreu o mesmo procedimento observado no segundo dia, com um objeto não familiar na segunda exposição do animal diferente dos apresentados no dia anterior.

Foi quantificado o tempo total de exploração de cada objeto. Foi considerada uma aproximação quando o animal manifestou interesse pelo objeto (tentou cheirá-lo, mexeu vigorosamente as vibrissas) a tal ponto de chegar a uma distância  $\leq 2$  cm do objeto. Todos esses experimentos foram filmados para permitir uma análise acurada (ENNACEUR; DELACOUR, 1988; ENNACEUR *et al.* 2005).

#### 4.6 CAMPO ABERTO (CA)

O campo aberto é um aparato que consiste em uma arena de metal ou madeira, de aspecto circular, com 1 metro de diâmetro e 50 cm de altura. O teste tem início quando os animais são colocados sobre o círculo central, sendo seus comportamentos motores avaliados por um período pré-determinado de 5 minutos. Foram mensurados parâmetros como a distância percorrida pelos animais e a velocidade. Todas as análises foram registradas e realizadas por meio de câmera digital acoplada ao sistema Smart Junior (Panlab, - Harvard Apparatus Espanha).

#### 4.7 PROCEDIMENTO DE ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS (MICROINFUSÃO INTRAESTRIATAL)

Os animais foram gentilmente imobilizados para, dessa forma, permitirem a microinfusão das drogas (raclopride ou piribedil). Esse tipo de procedimento é adotado no intuito de evitar o uso de anestésicos ou sedativos durante a manipulação, muito embora tal prática pudesse facilitar a administração das drogas. Fatalmente essa abordagem traria possíveis alterações no padrão do ciclo vigília-sono desses animais.

As microinjeções bilaterais foram realizadas no período inicial do ciclo claro (entre 7:00 e 9:00 h), por meio de agulhas injetoras 30-gauge, introduzidas através das cânulas guia, permitindo a infusão de raclopride (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) ou piribedil (3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) em um volume de 1  $\mu\text{L}$  (LIMA *et al.*, 2008). A concentração das drogas utilizadas foi definida a partir de um experimento piloto. O controle do fluxo das drogas foi realizado por meio de uma bomba eletrônica (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brasil) utilizando uma razão de 0,33  $\mu\text{L}/\text{min}$  totalizando três minutos de infusão, seguido de mais um minuto onde a agulha foi mantida no sítio de infusão, evitando assim possíveis refluxos. Em paralelo, foram realizadas microinfusões sham (referentes aos grupos controle), que consistiram exatamente do mesmo procedimento descrito até o momento, com exceção da presença das drogas, que foram substituídas por veículo dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos).

#### 4.8 REGISTRO ELETROFISIOLOGICO DO PADRÃO VIGÍLIA-SONO

Os sinais eletrofisiológicos foram adquiridos através de um polígrafo digital (Neurofax QP 223A ©Nihon Kohden, Japão) utilizando uma frequência de amostragem de 200 Hz, além de filtros de passagem de 35 e 60 Hz a um tempo constante de 0,1 s, para a atividade cortical e 70 Hz a 0,03 s para o registro eletromiográfico. Todos os sinais foram calibrados em pulsos de 50  $\mu\text{V}$ . Em animais homeotérmicos, o sono é dividido em dois estágios principais distintos: sono não-REM e sono REM. O primeiro é caracterizado por oscilações de alta voltagem de caráter lento, associado a picos fracos de atividade eletromiográfica. Já durante o

sono REM, a atividade eletrofisiológica é comparável aos níveis observados na vigília, com pronunciada e sustentada atividade de ritmo teta hipocampal, além de completa ausência de atividade eletromiográfica (TIMO-IARIA *et al.* 1970). Os estagiamentos do padrão vigília-sono foram realizados em intervalos (épocas) de 30 segundos utilizando a seguinte classificação: vigília, sono não-REM e sono REM.

#### 4.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E COLINA ACETIL-TRANSFERASE (ChAT)

Após os testes comportamentais, os animais foram sedados com xilasina (10 mg/kg) e anestesiados com quetamina (90 mg/kg). Na sequência, ocorreu a perfusão intracardiaca com solução salina, seguida de solução fixadora (formaldeído a 4%, diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4). Os encéfalos foram removidos dos crânios e foram imersos, durante 48 horas, em solução de fixação a 4 °C. Posteriormente, foram colocados em solução de sacarose a 30 % durante três dias e, logo após, foram congelados a -80 °C.

Os encéfalos congelados foram seccionados no criostato resultando em três secções por estrutura, de acordo com as seguintes coordenadas obtidas a partir do bregma: -4,92 mm à -5,28 mm, para a SNpc; -6,72 mm à -8,52 mm, para o PPT (PAXINOS; WATSON, 2005).

Para a SNpc, as secções de tecido foram incubadas com o anticorpo primário camundongo anti-TH, diluído em solução de tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100 (1:500; Chemicon, CA, EUA), durante a noite a 4 °C. Para o PPT, foi utilizado o anticorpo primário cabra anti-ChaT, diluído em solução de tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100 (1:100; Chemicon, CA, EUA). A incubação do anticorpo secundário conjugado com biotina (1:200 de anti-camundongo # Vector Laboratories, EUA para a SNpc; 1:200 de anti-cabra Vector Laboratories, EUA para o PPT), foi realizada durante 2 h à temperatura ambiente. Após várias lavagens com solução salina tamponada com fosfato, o anticorpo foi localizado usando o sistema ABC (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, EUA), seguido por 3,3'-diaminobenzidina com reforço de sulfato de níquel. As secções foram então montadas em lâminas revestidas com gelatina e lamínulas, após desidratação em concentrações crescentes de soluções de etanol-xileno.

As imagens foram obtidas usando microscópio motorizado Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), equipado com um sistema VSlide de digitalização automatizada (Metasystems, Altussheim, DE). Para o PPT, foram feitas contagens utilizando o software Image-Pro Express 6 (Media Cybernetics, EUA). Para cada grupo de ratos, um valor médio foi calculado. Para a SNpc, a densidade de neurônios TH-ir foi determinada com o auxílio do software Image-Pro Express versão 6 (Media Cybernetics, EUA).

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES E SEUS METABÓLITOS PRESENTES NO ESTRIADO E SNpc POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ELETROQUÍMICO (HPLC-ED)

As concentrações endógenas de dopamina (DA) e do 3,4-ácido diidroxifenilacético (DOPAC) foram determinadas através de HPLC-ED por meio de coluna C-18 de fase reversa. Brevemente, o sistema consiste de uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RP C-18 (150 x 4.6 mm i.d., 4 µm de tamanho de partícula) acoplada a pré-coluna Security Guard Cartridges Fusion-RP (4 x 3.0 mm) e detector eletroquímico (ED) ESA Coulochem III Electrochemical equipado com célula guarda de 350 mV ESA 5011A e bomba injetora LC-20AT manual Shimadzu (Rheodyne 7725) com loop de 20 µL. A coluna foi mantida em temperatura controlada (25°C; Shimadzu). A célula contém duas câmaras em série: cada câmara incluindo um eletrodo coulométrico de grafite, um eletrodo duplo de contagem e um eletrodo duplo de referência. Os potenciais de oxidação foram ajustados para 100 mV para o primeiro eletrodo e a 450 mV para o segundo eletrodo. As amostras de tecido foram homogeneizadas por meio de sonicador (Sonics) em 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabisulfito de sódio como padrão interno. Após centrifugação a 10.000 x g por 30 min a 4°C, foi injetado 20 µL do sobrenadante no cromatógrafo. A fase móvel utilizada foi injetada numa razão de 1 mL/min e apresentou a seguinte composição: 20 g ácido cítrico monoidratado (Merck), 200 mg ácido 1-octano sulfônico (Merck), 40 mg de ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) (Sigma) em 900 mL de água HPLC-grade. O pH do tampão de corrida foi ajustado para 4.0, depois filtrado em filtro de poro com 0.45 µm de diâmetro. Em seguida, foi

adicionado metanol (Merck) até atingir-se uma concentração final de 10% (v/v). As concentrações dos neurotransmissores e seus metabólitos foram calculadas usando-se uma curva padrão gerada por meio de um ensaio em triplicata, utilizando-se uma razão entre as diferentes concentrações obtidas e os padrões internos. A unidade utilizada para expressar essas quantificações foi ng/g de peso seco de tecido.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA), uma vez que os dados foram considerados paramétricos. Utilizou-se ANOVA de uma via (CA, Registro do sono, Imuno-histoquímica, HPLC), seguida do pós- teste de Newman-Keuls e ANOVA de duas vias (RDO) seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores foram expressos como média + E.P.M (erro padrão da média). O nível de significância de  $p \leq 0,05$  foi considerado para que se rejeitasse a hipótese de nulidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CAMPO ABERTO

Não foi observada diferença significativa na atividade locomotora entre os animais dos diferentes grupos após a PSREM [ $F(11,132)=1,33$ ;  $p=0,22$ ] (FIGURA 3A), e após o REB [ $F(11,134)=1,03$ ;  $p=0,42$ ] (FIGURA 3B).

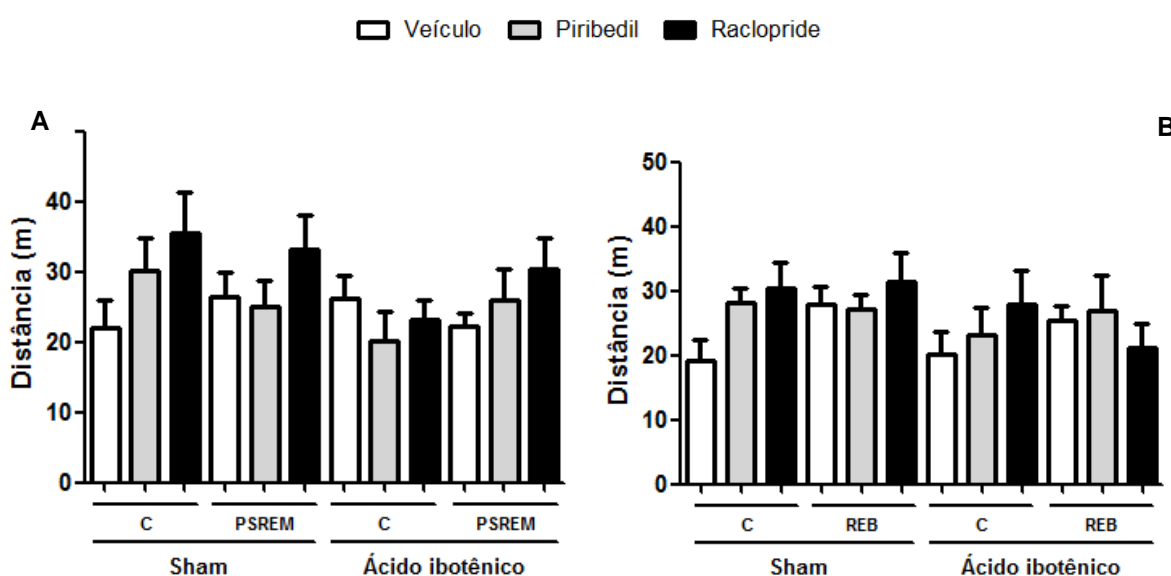


FIGURA 3. Distância percorrida pelos animais no teste do Campo Aberto realizado após PSREM (A) e após o período de REB (B). As barras representam as médias  $\pm$  Erro Padrão da média (E.P.M.). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls.  $n=10$ /grupo.

### 5.2 TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

No teste de reconhecimento de objetos realizado logo após a PSREM (FIGURA 4A), observou-se um efeito dos grupos [ $F(11,138)=4,27$ ;  $p\leq 0,001$ ], do objeto [ $F(1,138)=76,54$ ;  $p\leq 0,001$ ] e da interação dos fatores grupos e objeto [ $F(11,138)=2,10$ ;  $p\leq 0,05$ ]. Foi observado que o grupo sham-controle-veículo demonstrou aprendizado, explorando o objeto não-familiar por um tempo significativamente maior que o objeto familiar ( $p\leq 0,01$ ). O mesmo ocorreu para os seguintes grupos: sham-controle-piribedil ( $p\leq 0,05$ ); sham-controle-raclopride ( $p\leq 0,05$ ); sham-PSREM-veículo ( $p\leq 0,05$ ); sham-PSREM-piribedil ( $p\leq 0,01$ ); sham-PSREM-raclopride ( $p\leq 0,001$ ); ácido ibotênico-PSREM-veículo ( $p\leq 0,05$ ); ácido

ibotênico-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,001$ ); ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,01$ ). Além disso, foi observado um tempo de exploração do objeto não-familiar significativamente maior no grupo sham-PSREM-piribedil quando comparado ao grupo sham-controle-piribedil ( $p \leq 0,05$ ) e do grupo sham-PSREM-raclopride quando comparado ao grupo sham-controle-raclopride ( $p \leq 0,001$ ). Em relação aos animais que foram lesionados, houve um aumento significativo no tempo de exploração do objeto não-familiar do grupo ácido ibotênico-PSREM-veículo em relação ao grupo ácido ibotênico-controle-veículo ( $p \leq 0,01$ ) e no grupo ácido ibotênico-PSREM-piribedil em relação aos grupos ácido ibotênico-controle-piribedil ( $p \leq 0,001$ ) e ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,01$ ). Finalmente, foi observada uma diminuição do tempo de exploração do objeto não-familiar do grupo ácido ibotênico-PSREM-raclopride em relação ao grupo sham-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,05$ ).

Quando os animais foram submetidos ao teste após o período REB (FIGURA 4B), observou-se um efeito do objeto [ $F(1,176)=66,97$ ;  $p \leq 0,001$ ], não sendo observado efeito dos grupos [ $F(11,176)=1,35$ ;  $p=0,20$ ] e da interação dos fatores grupos e objeto [ $F(11,176)=0,47$ ;  $p=0,92$ ]. Foi demonstrado aprendizado pelos grupos sham-controle-veículo ( $p \leq 0,05$ ), sham-controle-piribedil ( $p \leq 0,05$ ); sham-controle-raclopride ( $p \leq 0,001$ ), sham-PSREM-veículo ( $p \leq 0,01$ ), sham-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,01$ ), sham-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,05$ ), ácido ibotênico-controle-veículo ( $p \leq 0,01$ ), ácido ibotênico-controle-piribedil ( $p \leq 0,01$ ), ácido ibotênico-controle-raclopride ( $p \leq 0,001$ ), ácido ibotênico-PSREM-veículo ( $p \leq 0,001$ ) e ácido ibotênico-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, observou-se uma diminuição do tempo de exploração do objeto não-familiar do grupo ácido ibotênico-PSREM-raclopride em relação ao grupo sham-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,05$ ).



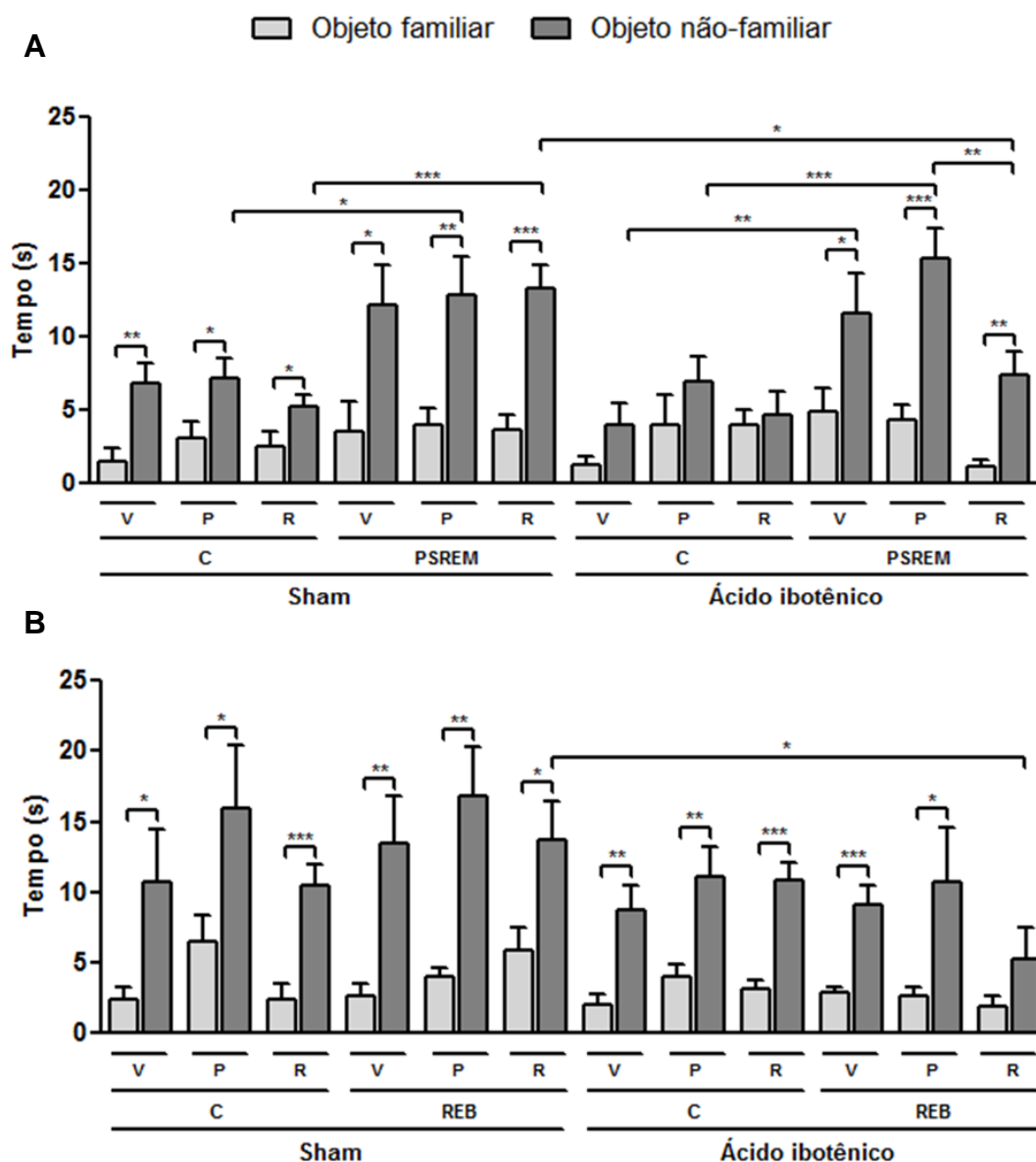


FIGURA 4. Tempo de exploração do objeto familiar e do objeto não-familiar no teste Reconhecimento de objetos após a PSREM (A) e após o período REB (B). As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . V, veículo; P, piribedil; R, raclopride.  $n=10$ /grupo.

### 5.3 REGISTRO DE SONO

A partir do registro eletrofisiológico do padrão vigília-sono dos animais foi possível observar a porcentagem de tempo despendida em vigília, sono não-REM e sono REM (FIGURA 5A, 5B e 5C, respectivamente) durante o ciclo claro. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos em relação ao tempo despendido

em vigília durante o ciclo claro [ $F(11,79)=2,10$ ;  $p\leq 0,05$ ] (FIGURA 5A), sendo que o grupo ácido ibotênico-controle-piribedil apresentou uma porcentagem de tempo significativamente maior no estado de vigília quando comparado aos grupos ácido ibotênico-controle-veículo ( $p\leq 0,05$ ) e ácido ibotênico-PSREM-piribedil ( $p\leq 0,001$ ). Ainda, o grupo ácido ibotênico-PSREM-raclopride apresentou uma quantidade de tempo maior em vigília quando comparado ao grupo ácido ibotênico-PSREM-piribedil ( $p\leq 0,001$ ). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à porcentagem de tempo em sono não-REM durante o ciclo claro [ $F(11,79)=1,24$ ;  $p=0,27$ ] (FIGURA 5B). Em relação à porcentagem de tempo em sono REM (FIGURA 5C), foram encontradas diferenças significativas [ $F(11,79)=5,21$ ;  $p\leq 0,001$ ], sendo que o grupo sham-PSREM-raclopride passou uma maior quantidade de tempo em sono REM quando comparado aos grupos sham-controle-raclopride ( $p\leq 0,05$ ) e ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p\leq 0,01$ ). Além disso, o grupo ácido ibotênico-PSREM-piribedil também apresentou maior porcentagem de tempo em sono REM quando comparado ao grupo ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p\leq 0,01$ ) e ao grupo ácido ibotênico-controle-piribedil ( $p\leq 0,01$ ).

No ciclo escuro, observou-se uma diferença entre os grupos em relação à porcentagem de tempo em vigília [ $F(11,73)=2,05$ ;  $p\leq 0,05$ ] (FIGURA 6A). O grupo sham-PSREM-raclopride apresentou maior porcentagem de tempo em vigília quando comparado com os grupos sham-controle-raclopride ( $p\leq 0,001$ ) e ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p\leq 0,001$ ). Além disso, o grupo ácido ibotênico-PSREM-raclopride também apresentou uma menor porcentagem de tempo em vigília quando comparado ao grupo ácido ibotênico-controle-raclopride ( $p\leq 0,05$ ). Em relação ao sono não-REM [ $F(11,73)=1,60$ ;  $p=0,12$ ] (FIGURA 6B), foi observado que o grupo sham-PSREM-raclopride apresentou uma porcentagem de tempo menor que os grupos sham-controle-raclopride ( $p\leq 0,001$ ) e ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p\leq 0,01$ ). Ainda, foi possível observar um aumento do grupo sham-controle-raclopride em relação ao grupo sham-controle-piribedil ( $p\leq 0,05$ ). Finalmente, para o sono REM [ $F(11,73)=1,95$ ;  $p\leq 0,05$ ] (FIGURA 6C), não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos.

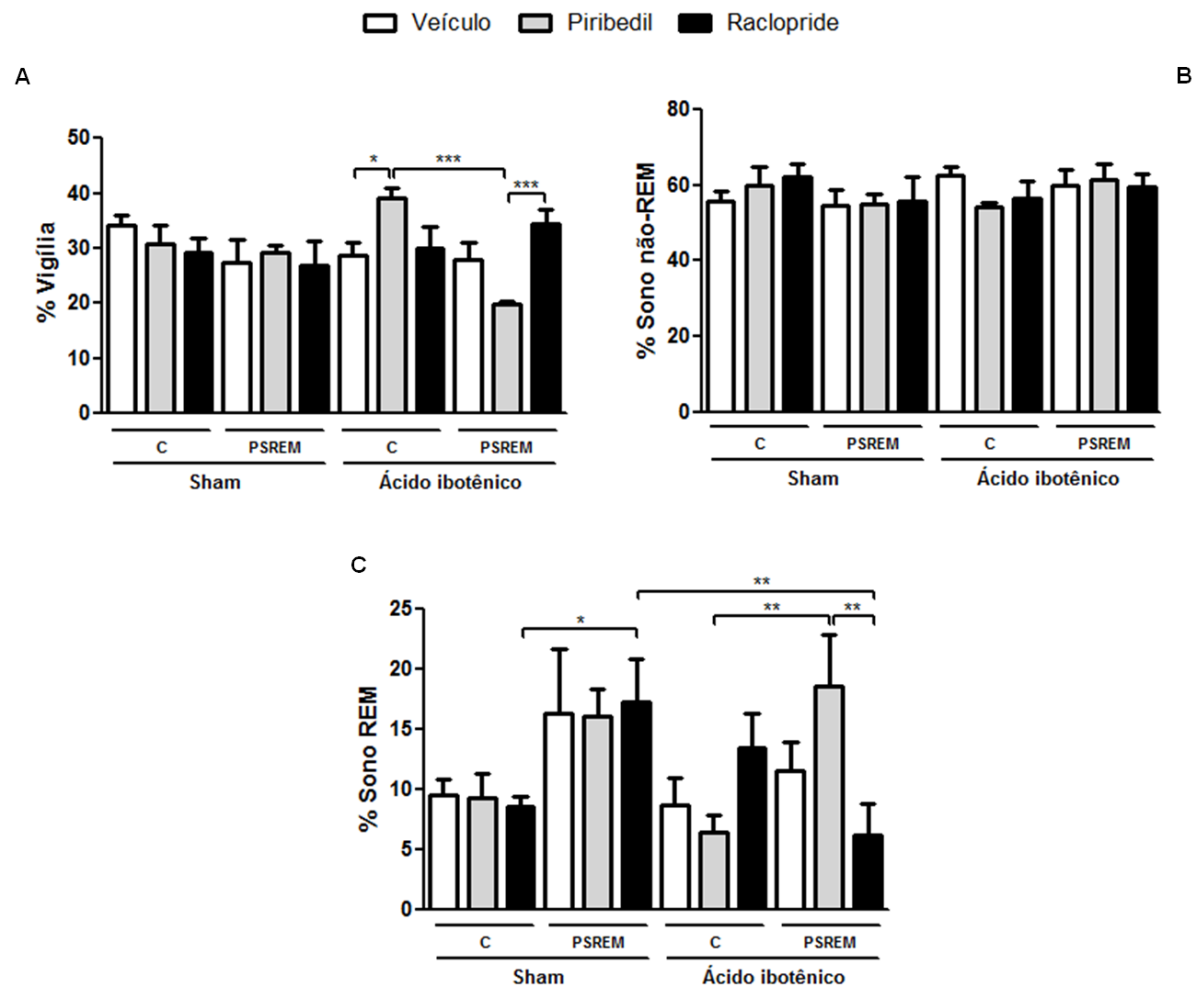


FIGURA 5. Porcentagem de tempo em vigília (A), em sono não-REM (B) e em sono REM (C) durante o ciclo claro. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $n=5$ /grupo.

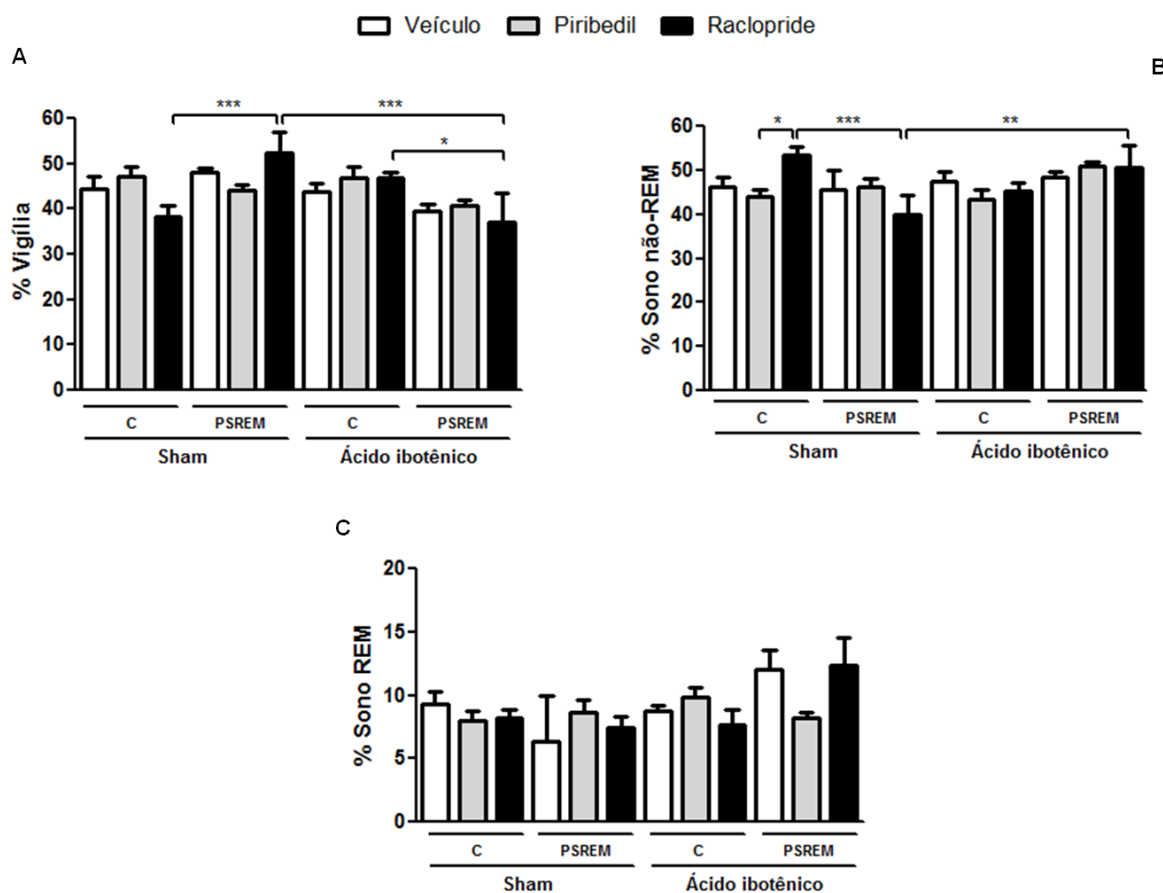


FIGURA 6. Porcentagem de tempo em vigília (A), em sono não-REM (B) e em sono REM (C) durante o ciclo escuro. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .  $n=5$ /grupo.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE DOPAMINA E SEU METABÓLITO (DOPAC) PRESENTES NO ESTRIADO E SNpc POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR ELETROQUÍMICO (HPLC-ED)

As quantificações neuroquímicas da SNpc foram realizadas para DA e para o seu metabólito DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético). Em relação aos níveis dopaminérgicos foi observada uma diferença significativa entre os grupos [ $F(11,68)=4,14$ ;  $p \leq 0,001$ ] (FIGURA 7<sup>a</sup>), sendo demonstrada por uma diminuição nos níveis de dopamina no grupo sham-controle-raclopride quando comparado ao grupo sham-controle-veículo ( $p \leq 0,001$ ) e uma diminuição no grupo sham-PSREM-raclopride quando comparado ao grupo sham-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,05$ ). Semelhantemente, foi encontrada uma diferença significativa entre os grupos nos níveis de DOPAC [ $F(11,72)=2,78$ ;  $p \leq 0,01$ ] (FIGURA 7B), demonstrada por um

aumento dos níveis desse metabólito no grupo sham-controle-piribedil quando comparado aos grupos sham-controle-veículo ( $p \leq 0,05$ ), sham-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,05$ ) e ácido ibotênico-controle-piribedil ( $p \leq 0,01$ ). Ainda, em relação ao *turnover* (FIGURA 7C), foi observado que os grupos diferiram significativamente [ $F(11,61)=4,30$ ;  $p \leq 0,001$ ], sendo que o grupo sham-controle-piribedil apresentou uma taxa de renovação maior quando comparado aos grupos sham-controle-veículo ( $p \leq 0,01$ ), sham-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,01$ ) e ácido ibotênico-controle-piribedil ( $p \leq 0,01$ ). Além disso, houve um aumento na taxa de renovação do grupo sham-controle-raclopride quando comparado ao grupo sham-controle-veículo ( $p \leq 0,05$ ).

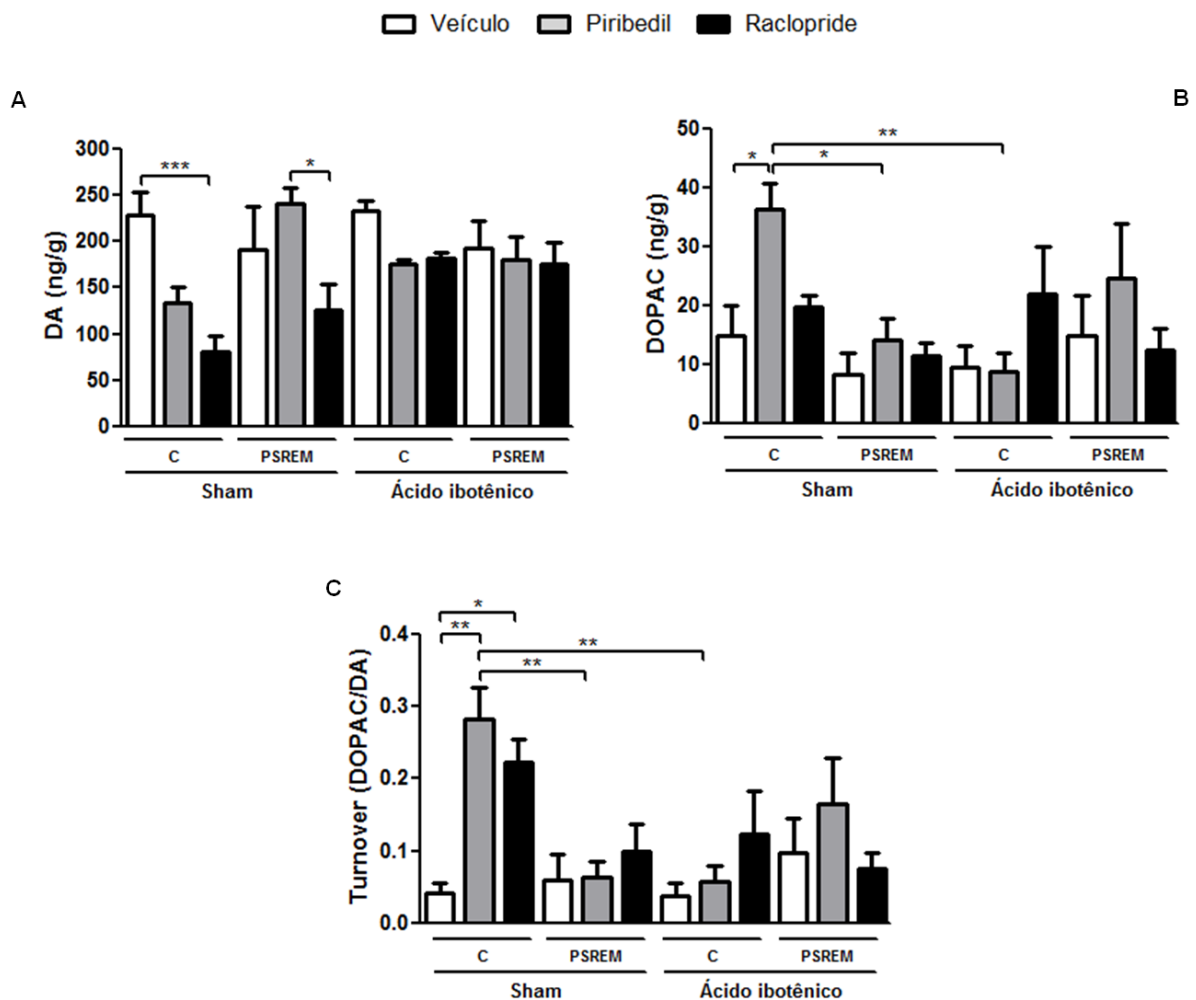


FIGURA 7. Quantificação dos níveis de DA (A), seu metabólito DOPAC (B) e o turnover (C) na SNpc. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . DA, dopamina; DOPAC, Ácido 3,4-diidroxifenilacético.  $n=5$ /grupo.

Os níveis dopaminérgicos estriatais foram quantificados e foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos [ $F(11,71)=3,06$ ;  $p \leq 0,01$ ]

(FIGURA 8A), demonstrada por um maior nível de DA no grupo ácido ibotênico-PSREM-veículo quando comparado aos grupos ácido ibotênico-PSREM-piribedil ( $p \leq 0,05$ ), ácido ibotênico-PSREM-raclopride ( $p \leq 0,01$ ), ácido ibotênico-controle-veículo ( $p \leq 0,05$ ) e sham-PSREM-veículo ( $p \leq 0,01$ ). Em relação aos níveis de DOPAC (FIGURA 8B), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos [ $F(11,66)=1,48$ ;  $p=0,16$ ]. Finalmente, a taxa de renovação significativamente diferiu entre os grupos [ $F(11,59)=2,39$ ;  $p \leq 0,05$ ] (FIGURA 8C), demonstrada por um maior *turnover* no grupo sham-PSREM-veículo em relação ao grupo ácido ibotênico-PSREM-veículo ( $p \leq 0,05$ ).

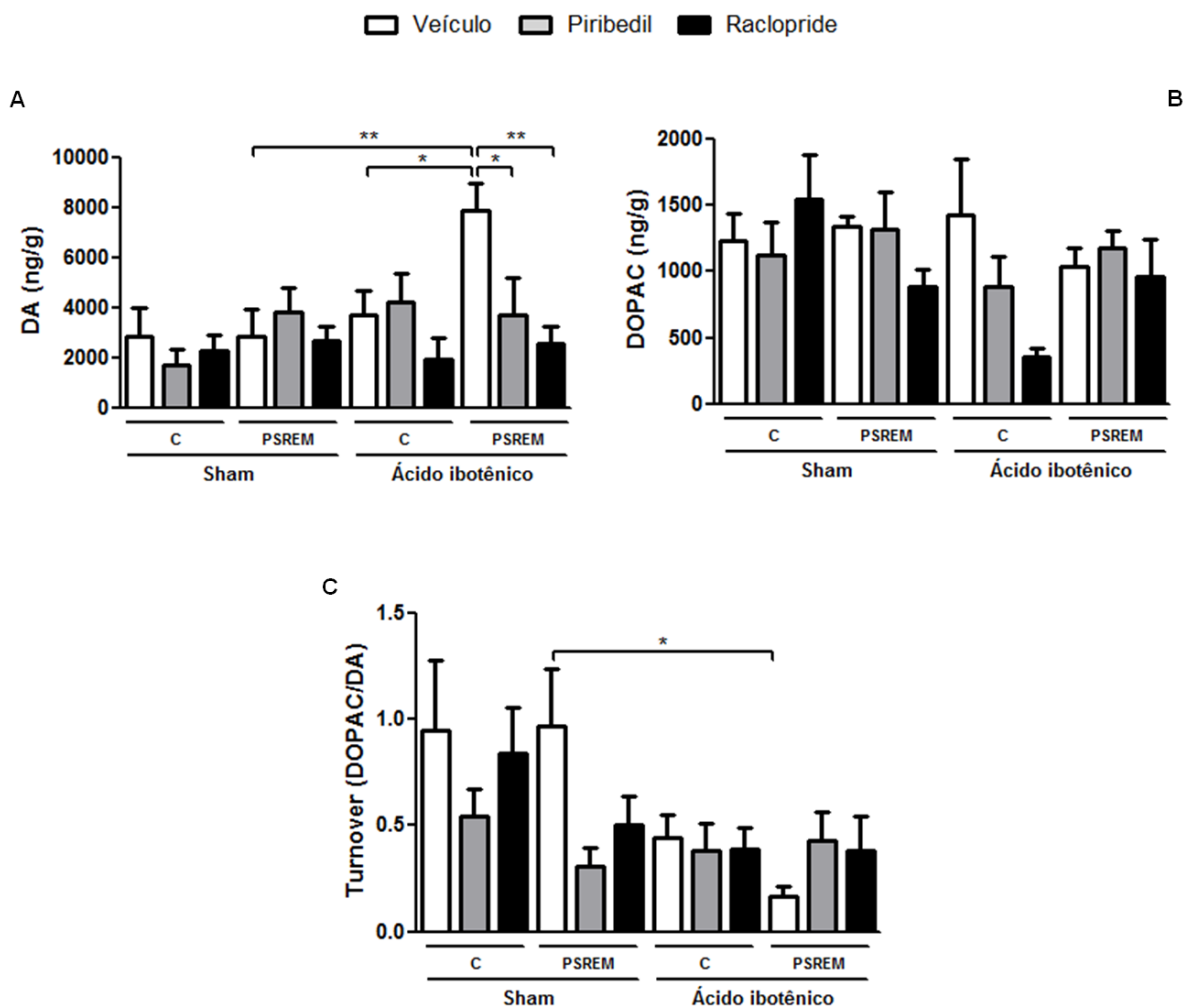


FIGURA 8. Quantificação dos níveis de DA (A), seu metabólito DOPAC (B) e o turnover (C) na estriado. As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . DA, dopamina; DOPAC, Ácido 3,4-diidroxifenilacético.  $n=5$ /grupo.

## 5.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Por meio da imuno-histoquímica para colina acetil-transferase (ChAT) no PPT não foi possível observar diferenças na quantidade de neurônios ChAT imunorreativos (ChAT-ir) entre os grupos [ $F(11,47)=0,73$ ;  $p=0,70$ ] (FIGURA 9A). De forma semelhante, também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número de neurônios tirosina hidroxilase imunorreativos (TH-ir) na SNpc [ $F(11,33)=1,17$ ;  $p=0,36$ ] (FIGURA 9B).

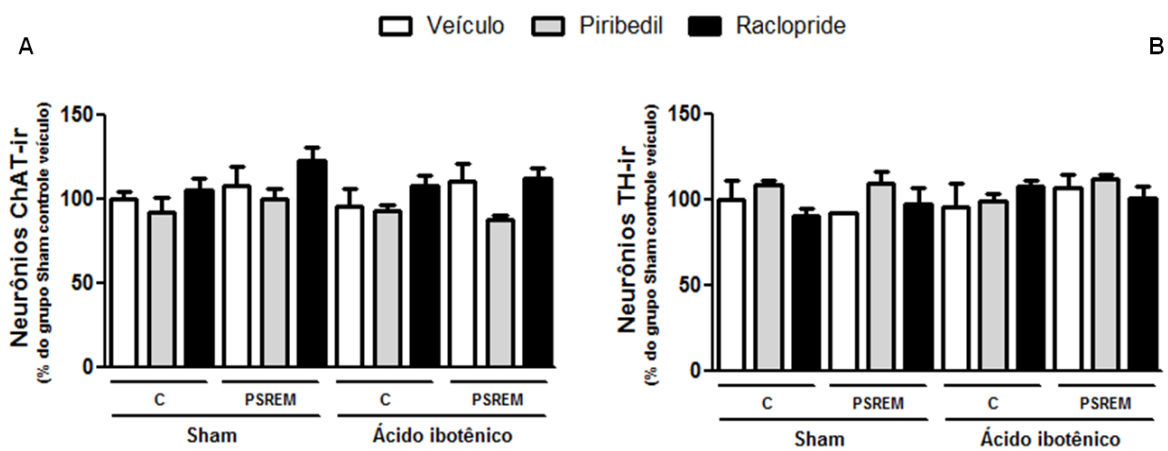


FIGURA 9. Quantificação dos neurônios ChAT-ir no PPT (A) e dos neurônios TH-ir na SNpc (B). As barras representam as médias + E.P.M. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Newman-Keuls. ChAT-ir, neurônios imunorreativos à Colina Acetil Transferase; TH-ir, neurônios imunorreativos à Tirosina Hidroxilase.  $n=5$ /grupo.

## 6 DISCUSSÃO

O PPT é uma estrutura classicamente relacionada à regulação do ciclo vigília-sono. Além disso, o papel dessa estrutura em relação à motricidade e aprendizado tem sido bastante discutido nas últimas décadas (SKINNER; GARCIA-RILL, 1984; STECKLER *et al.*, 1994; WINN, 2006; SCARNATI *et al.*, 2011). Sabe-se que o PPT e os gânglios da base, especialmente a SNpc, possuem muitas semelhanças: projetam-se para e recebem projeções de muitas estruturas em comum, possuem uma grande reciprocidade de aferências/eferências e estão envolvidos na regulação de muitos comportamentos como o aprendizado de determinadas tarefas, regulação do comportamento motor e, possivelmente, na regulação do ciclo vigília-sono (MENA-SEGOVIA; BOLAM; MAGILL, 2004). Obviamente essas estruturas não desempenham todos esses papéis de forma isolada do restante do sistema nervoso central, mas, a partir de evidências da literatura e dos dados obtidos nesse trabalho, acreditamos que haja uma interação extremamente eficiente e complexa entre essas estruturas no que tange a regulação do sono.

Atualmente, o PPT tem sido um alvo terapêutico para alguns sintomas motores da doença de Parkinson como o congelamento da marcha, sendo que alguns trabalhos demonstram que a estimulação encefálica profunda do PPT é capaz de promover uma melhora significativa desses sintomas (JENKINSON *et al.*, 2009; FERRAYE *et al.*, 2011). Em contrapartida, outros estudos apontam que lesões no PPT não são capazes de promover um prejuízo na atividade locomotora, corroborando os dados encontrados em nosso estudo (HOMS-ORMO *et al.*, 2003; STEINIGER; KRETSCHMER, 2004).

Pode-se argumentar que a ausência de efeito a partir da lesão deve-se à própria ausência da lesão, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre os animais que receberam ácido ibotênico e animais que receberam apenas o veículo na imuno-histoquímica para ChAT no PPT. No entanto, em outros parâmetros analisados nesse estudo observamos efeitos promovidos pela lesão. Assim, duas alternativas podem ser consideradas: 1) a lesão realizada foi muito pequena, uma vez que essa não foi evidenciada pela contagem dos neurônios ChAT-ir. Consequentemente, não foi possível que se promovesse um prejuízo



motor. No entanto, essa lesão, mesmo pequena, foi capaz de promover efeitos em outros parâmetros analisados; 2) Existe a possibilidade de um viés metodológico em relação à localização exata do PPT para a contagem de neurônios ChAT-ir, uma vez que o PPT é um núcleo pequeno e talvez neurônios adjacentes tenham sido abrangidos na contagem. Dessa forma, acredita-se que a lesão não tenha demonstrado efeito na locomoção por um efeito de compensação de outras estruturas e de seus sistemas de neurotransmissão (STECKLER *et al.*, 1994).

A dopamina tem um papel bem estabelecido no comportamento motor. Isso pode ser observado em contextos fisiopatológicos que envolvem um desequilíbrio nos níveis dopaminérgicos como na doença de Parkinson, uma vez que tanto em indivíduos acometidos por essa doença como em modelos animais há uma série de prejuízos motores (LIMA; REKSIDLER; VITAL, 2008; LIMA *et al.*, 2012). No entanto, não foi observado efeito da modulação dos receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D<sub>2</sub> no perfil motor dos animais. Estudos demonstram que o piribedil administrado intraperitonealmente é capaz de diminuir a atividade locomotora quando administrado em doses baixas (2 mg/kg) e é capaz de aumentar essa atividade quando em doses maiores (32 mg/kg). Porém, numa dose intermediária (8 mg/kg) essa droga não parece apresentar efeitos na locomoção (DAHL; GOTESTAM, 1989). Portanto, tendo em vista a dose utilizada no presente estudo (10 µg/kg) por meio de cirurgia estereotáxica, acredita-se que a ausência de diferenças significativas entre os grupos em relação à motricidade seja devido à dose utilizada, uma vez que essa droga possui efeitos diversos sob diferentes doses. O mesmo pode ser observado para o raclopride. Estudos demonstram que esse antagonista dopaminérgico é capaz de induzir comportamentos opostos dependendo da dose administrada (SALMI *et al.*, 1998; SIMÓN *et al.*, 2000).

Animais privados de sono REM podem apresentar uma hiperatividade, atribuída à ocorrência de uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos (TUFIK; LINDSEY; CARLINI, 1978; TUFIK *et al.*, 1987; NUNES *et al.*, 1994). Entretanto, muitos estudos demonstram que períodos curtos de privação de sono não são eficazes em aumentar a atividade locomotora avaliada pela distância percorrida no teste do campo aberto (PROENÇA *et al.*, 2013; MATURANA *et al.*, 2014).

Dessa forma, é possível concluir que não houve efeito da lesão no PPT, da PSREM e da modulação dos receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D<sub>2</sub> sobre o perfil locomotor dos animais, evidenciando a ausência de um viés motor durante o RDO e o registro de sono.

Muitos trabalhos apontam a influência do sono na consolidação de memórias (GRAVES; PACK; ABEL, 2001; TONONI; CIRELLI, 2013; GROCH *et al.*, 2013). Mais especificamente, trabalhos demonstram uma participação do sistema dopaminérgico, principalmente dos gânglios da base, e do PPT na consolidação de certos tipos de memórias, particularmente não-declarativas (SHAPOVALOVA; KAMKINA, 2008; VOLKOW *et al.*, 2009; BORTOLANZA *et al.*, 2010; BAUDONNAT *et al.*, 2013; ECKART *et al.*, 2014). No entanto, a avaliação de uma memória do tipo declarativa, por meio do teste de reconhecimento de objetos, com os tratamentos utilizados nesse trabalho, ainda não foi realizada. Ainda, é de grande interesse observar um possível efeito indireto do sistema dopaminérgico sobre a memória, por meio do efeito desse sistema sobre a porcentagem em sono REM.

Nossos resultados demonstraram que, no primeiro dia de teste, correspondente ao período logo após a privação de sono REM, os animais do grupo sham demonstraram aprendizado, uma vez que exploraram o objeto não-familiar por um tempo significativamente maior que o objeto familiar. Observou-se que a privação de sono REM foi capaz de aumentar o reconhecimento do objeto não-familiar, sendo que os grupos PSREM-raclopride e PSREM-piribedil exploraram mais o objeto não-familiar quando comparados a seus respectivos controles. Contrariamente, os animais com lesão no PPT não privados de sono REM não conseguiram distinguir os dois objetos, demonstrando uma influência do PPT nesse tipo de memória. No entanto, de forma surpreendente, a privação de sono REM reverteu o efeito prejudicial promovido pela lesão, fazendo com que os animais fossem capazes de distinguir os objetos.

Sabe-se que as áreas significativas para o reconhecimento de objetos em ratos são o córtex entorrinal e o córtex perirrinal, apesar de muitos trabalhos também demonstrarem a influência de outras estruturas (STECKLER *et al.*, 1998a; RUBY *et al.*, 2013). Estudos a respeito do papel dos gânglios da base, especialmente a SNpc e o PPT nesse tipo de memória são escassos (STECKLER *et al.*, 1998a). Proença e colaboradores (2014) observaram que a ativação dos receptores dopaminérgicos

pela administração de piribedil foi capaz de promover uma melhora na memória de animais no RDO e que um bloqueio pelo haloperidol foi capaz de promover um efeito inverso. Esses dados contrastam com os resultados do presente estudo, uma vez que não encontramos efeito da modulação dos receptores dopaminérgicos no RDO. No entanto, é importante ressaltar que em nosso estudo foi realizada a infusão diretamente no estriado por meio de cânulas-guia implantadas durante cirurgia estereotáxica, enquanto que no estudo citado as drogas foram administradas por via intraperitoneal. Além disso, o antagonista utilizado em nosso estudo é seletivo para receptores  $D_2/D_3$ , diferentemente do haloperidol que é muito menos seletivo. Ainda, nossas análises foram baseadas no tempo de exploração, enquanto que no outro trabalho as análises foram feitas a partir da frequência de exploração, parâmetros que podem proporcionar resultados divergentes (ENNACEUR *et al.*, 2005). Wang e colaboradores (2009) observaram que, após a administração de MPTP na SNpc de ratos houve um prejuízo no teste de reconhecimento de objetos. Entretanto, com a utilização dessa droga, observou-se uma perda de células em outras áreas como o hipocampo e houve ativação da micróglia, além de ter sido observado um aumento no comportamento de ansiedade, o que poderia contribuir para o prejuízo observado (WANG *et al.*, 2009; SY *et al.*, 2010). Apesar disso, outros estudos indicam um papel reduzido do sistema dopaminérgico em relação a esse tipo de tarefa (STECKLER *et al.*, 1998b). Dessa forma, nossos dados vão ao encontro da maioria dos dados encontrados na literatura, uma vez que não observamos efeito da modulação dos receptores dopaminérgicos estriatais no tempo de exploração dos objetos no RDO.

Nossos dados demonstraram um prejuízo causado pela lesão com ácido ibotênico no PPT sobre a tarefa de memória utilizada. Alguns estudos corroboram nossos dados, apontando para uma influência dessa estrutura sobre processos atencionais. O PPT possui muitas conexões com centros importantes nos processos de atenção como o tálamo, gânglios da base e o prosencéfalo basal como um todo. Além disso, alguns trabalhos demonstram que a lesão no PPT promove um efeito no aprendizado dependente da dificuldade da tarefa adotada (DELLU *et al.*, 1991; STECKLER *et al.*, 1994; INGLIS; OLMSTEAD; ROBBINS, 2001; JAEGER *et al.*, 2013).

Grande parte da literatura tem demonstrado efeitos prejudiciais na memória associados à privação de sono, dentro de diferentes paradigmas. No entanto, alguns

estudos demonstram a ausência de um efeito e, a minoria, um efeito benéfico. Rasch e colaboradores (2009) demonstraram que a privação de sono REM foi capaz de melhorar o aprendizado numa tarefa relacionada a uma memória de procedimento. Alguns trabalhos corroboram esse achado, demonstrando que a privação de sono REM não possui um efeito prejudicial em certas memórias dependentes do estriado (WATTS *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a privação de sono REM gera uma supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos, o que poderia explicar o aumento no tempo de exploração do objeto não-familiar nos animais sham privados de sono REM (TUFIK; LINDSEY; CARLINI, 1978). Ainda, Rauchs e colaboradores (2011) propõem que haja uma organização das memórias adquiridas, de forma que as memórias que são importantes dentro de um contexto qualquer são mantidas e as memórias menos importantes ou inúteis são enfraquecidas ou extintas. Ao expor uma série de palavras com a instrução “lembrar” ou “esquecer” após cada palavra, esses autores submeteram um grupo de voluntários à privação de sono total e outro grupo dormiu normalmente. A partir disso, observaram que indivíduos privados de sono lembravam as palavras com a instrução “lembrar” na mesma proporção que indivíduos que dormiram normalmente. No entanto, os indivíduos privados de sono demonstraram maior eficiência em lembrar as palavras seguidas da instrução “esquecer”. Assim, uma vez que o aprendizado ao qual os ratos foram submetidos no teste de reconhecimento de objetos não envolve nenhum tipo de reforço (positivo ou negativo), acredita-se que o aprendizado durante o teste encaixa-se na instrução “esquecer”. Dessa forma, um maior tempo de exploração do objeto não-familiar pelos animais privados de sono REM durante o RDO seria proveniente da ausência de uma modulação favorável à extinção durante o período de sono. A privação de sono também é associada a um aumento no estresse dos animais, por ficarem em uma condição adversa e pelo isolamento (SUCHECKI; TUFIK, 2000). No entanto, autores observaram que animais isolados demonstraram um aumento de exploração e procura pelo novo após exposição ao estresse, o que também pode explicar, em parte, o ocorrido com os animais privados de sono durante o teste (THORSELL *et al.*, 2006; MAROUN; AKIRAV, 2008).

Quando o RDO foi realizado após o período rebote de sono, observamos que praticamente todos os animais reconheceram o objeto não-familiar, com

exceção de apenas um grupo (ácido ibotênico-PSREM-raclopride). Interessantemente, os animais com lesão no PPT e não privados de sono REM, os quais não haviam demonstrado aprendizado no dia anterior, exploraram o objeto não-familiar por mais tempo que o objeto familiar. Algumas hipóteses poderiam explicar essa situação observada. A primeira seria que a lesão do PPT tem um efeito prejudicial na memória que é tempo-dependente. Os animais realizaram o teste pela primeira vez no 8<sup>a</sup> dia após a cirurgia e no 9<sup>o</sup> dia pela segunda vez. Dessa forma, talvez tenhamos observado a faixa temporal na qual essa lesão apresenta efeito nesse tipo de memória, o que corroboraria os dados encontrados na imuno-histoquímica para ChAT no PPT. Uma segunda explicação para esse fenômeno seria que os animais com lesão possuem uma maior ansiedade e que isso faria com que eles demorassem mais para “demonstrar” que reconheceram um objeto não-familiar, fazendo isso apenas no segundo dia de teste. Porém, essa explicação apresenta algumas limitações por dois motivos principais: 1) estudos demonstram que uma lesão no PPT não altera a ansiedade dos animais (WALKER; WINN, 2007); 2) apesar do animal estar no primeiro dia de teste, essa é a quinta exposição do animal ao aparato (apenas a primeira com um dos objetos modificado), o que contribui por si só para uma diminuição da ansiedade. Outra explicação alternativa baseia-se nos achados de Ennaceur, Michalikova e Chazot (2009) ao demonstrarem que os animais, por habituação ao teste, têm a tendência em explorar mais rapidamente e por maior quantidade de tempo os objetos ao longo dos dias, o que pode ter contribuído para o que foi observado no período rebote do sono (ENNACEUR *et al.*, 2005; ENNACEUR; MICHALIKOVA; CHAZOT, 2009). Por fim, a última possibilidade aventada seria a de que os animais tenham tido uma preferência maior pelo objeto não-familiar utilizado no segundo dia de teste em relação ao objeto não-familiar utilizado no primeiro dia de teste. No entanto, é importante ressaltar que esses testes já foram realizados inúmeras vezes no nosso laboratório e que nunca foi observado algum tipo de preferência por um objeto e outro fora do contexto experimental. Ainda, mesmo que tenha havido uma preferência no segundo dia que tenha proporcionado esse aumento de exploração do objeto não-familiar nos animais lesionados não-privados, isso não exclui o fato de que os animais dos demais grupos foram capazes de reconhecer o objeto utilizado no primeiro dia de teste, enquanto esse grupo não foi. No entanto, se considerarmos

essa possibilidade, teremos uma situação semelhante ao que ocorreu com Delli e colaboradores (1991), na qual ratos lesionados, por apresentarem um prejuízo de atenção, não teriam percebido o objeto não-familiar no primeiro dia por ele ser “menos atrativo”. No entanto, no segundo dia, quando a dificuldade da tarefa foi diminuída, pela presença de um objeto não-familiar “mais atrativo”, esses animais com lesão conseguiram reconhecer esse objeto não-familiar.

Em relação à regulação do sono, diversos estudos demonstram o efeito da modulação dos receptores dopaminérgicos do tipo  $D_2$  por meio da administração de antagonistas seletivos para esses receptores (ONGINI *et al.*, 1992; OKURA *et al.*, 2000). Análises a respeito dos efeitos promovidos pelo raclopride na regulação do sono são relativamente escassas e, até o presente momento, nenhum trabalho demonstrou o efeito dessa droga na regulação do sono, quando administrada diretamente no estriado. Apesar de Qu e colaboradores (2010) identificarem um aumento de sono REM pela administração intraperitoneal de raclopride, nosso estudo não conseguiu reproduzir esse achado sem a privação de sono REM. No entanto, nossos dados são corroborados pelo estudo de Ongini e colaboradores (1993), no qual a administração subcutânea de raclopride não foi capaz de alterar a quantidade de sono REM.

Da mesma forma, muitos trabalhos avaliam o efeito da administração de agonistas dopaminérgicos não-seletivos ou seletivos para receptores  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$  na regulação do sono, porém os resultados podem ser contraditórios de acordo com a dose e via de administração (ONGINI; CAPORALI, 1987; KROPF; KUSCHINSKY, 1993; LAGOS *et al.*, 1998). Apesar disso, geralmente observa-se que a administração sistêmica de agonistas que agem em receptores  $D_2$  tem um efeito bifásico: quando em baixas doses atuam preferencialmente em autorreceptores, aumentando o sono; quando em altas doses atuam também nos receptores pós-sinápticos, promovendo a vigília (MONTI; MONTI, 2007). Interessantemente, em nosso estudo, não foi observado efeito do piribedil em condições normais, apenas quando associado à lesão no PPT e privação de sono REM.

Durante o ciclo claro, os animais sham privados de sono REM demonstraram uma tendência em aumentar a porcentagem de sono REM quando comparados aos animais sham não-privados de sono REM, evidenciando um possível efeito rebote. Entretanto, isso foi significativo apenas nos animais que

receberam raclopride, sendo que o grupo sham-PSREM-raclopride passou um tempo em sono REM significativamente maior que o grupo sham-controle-raclopride. A partir disso, observa-se que houve um efeito da privação de sono REM na porcentagem de sono REM apenas mediante um bloqueio do receptor D<sub>2</sub>. Acreditamos que esse efeito da privação de sono REM não tenha sido observado para os demais grupos devido ao tamanho amostral que não possibilitou a detecção de uma diferença estatisticamente significativa.

Ao quantificarmos os neurotransmissores na SNpc e no estriado observamos efeitos a partir da modulação dos receptores dopaminérgicos estriatais. Foi observada uma diminuição nos níveis de dopamina na SNpc dos animais não-lesionados que receberam raclopride em relação aos animais que receberam apenas veículo. Acredita-se que, a partir do bloqueio dos receptores D<sub>2</sub> pós-sinápticos, a dopamina presente na fenda sináptica atinge os autorreceptores, inibindo a liberação de mais neurotransmissor. Em relação ao grupo piribedil, observou-se um aumento de DOPAC bem como do *turnover* da dopamina, provavelmente devido a um efeito modulatório sobre a liberação de dopamina frente à ligação do agonista ao receptor D<sub>2</sub>.

Nos animais submetidos à lesão promovida pela infusão de ácido ibotênico no PPT, observou-se que aqueles que foram também privados de sono REM e receberam piribedil (grupo ácido ibotênico-PSREM-piribedil) apresentaram uma maior porcentagem de tempo em sono REM quando comparados ao seu controle. Entretanto, o mesmo não ocorreu nos grupos que receberam veículo e raclopride. Isso evidencia uma ação da privação de sono na quantidade de sono REM, apenas quando associada à ativação dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>.

Observamos que os animais com lesão, privados de sono REM e que receberam o veículo apresentaram uma liberação de dopamina estriatal maior quando comparados ao seu respectivo controle para lesão, provavelmente devido a um efeito compensatório, uma vez que os neurônios colinérgicos provenientes do PPT estão ativando menos a via nigroestriatal (MENA-SEGOVIA; WINN; BOLAM, 2008).

Em relação às análises do ciclo escuro não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos testados. Esses resultados eram esperados, uma vez que os efeitos da modulação dos receptores dopaminérgicos só foram observados

em animais privados de sono REM e, durante o ciclo escuro, boa parte do efeito do sono rebote possivelmente já havia sido compensado. Além disso, podemos sugerir que os efeitos proporcionados pelas drogas tenham sido observados durante o ciclo claro e que, no ciclo escuro isso não ocorreu em função de aspectos farmacocinéticos. Ainda, não se pode desconsiderar os próprios efeitos inerentes ao ritmo circadiano, uma vez que o ciclo escuro é um período em que existe uma predominância de vigília e sono não-REM, com uma diminuição do sono REM. Assim, com uma porcentagem de tempo despendida em sono REM relativamente baixa, a probabilidade de detectar diferenças significativas entre os grupos diminui. Surpreendentemente, no ciclo escuro, foi possível observar um efeito do bloqueio dos receptores dopaminérgicos, alterando a porcentagem despendida em sono não-REM, de acordo com o contexto, seja ele a privação de sono ou a lesão do PPT.

A partir dos resultados apresentados, principalmente considerando as variações observadas no ciclo claro, pode-se evidenciar a existência de uma interação entre os neurônios do PPT e a modulação dos receptores dopaminérgicos na regulação do sono REM, uma vez que em animais do grupo sham só foi possível observar efeito da privação de sono REM (em aumentar o sono REM em relação ao grupo controle) quando os receptores dopaminérgicos estavam bloqueados, sob efeito do raclopride. No entanto, quando os animais foram lesionados, esse efeito da privação de sono REM só foi observado mediante ativação dos receptores dopaminérgicos, sob efeito do piribedil. Outra evidência dessa interação entre PPT e receptores dopaminérgicos foi observada em relação ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos em animais privados de sono REM. Esse bloqueio foi capaz de aumentar a quantidade de sono REM nos animais sham e diminuir a quantidade de sono REM em animais com lesão, mostrando efeitos contrários do antagonista raclopride dependendo da presença ou ausência da lesão no PPT.

Lu e colaboradores (2006) propuseram que os principais responsáveis pela regulação do sono REM seriam neurônios GABAérgicos REM-*on* e neurônios GABAérgicos REM-*off*. Os neurônios GABAérgicos REM-*on* estariam presentes em maior proporção no núcleo SLD e teriam projeções inibitórias para os neurônios GABAérgicos REM-*off* e para centros promotores da vigília, como os neurônios noradrenérgicos do LC e serotoninérgicos do DRN. Os neurônios GABAérgicos REM-*off* estariam presentes em maior proporção na vIPAG e no LPT e teriam



projeções inibitórias para os neurônios GABAérgicos REM-on e para centros promotores do sono, como o PPT. Nossos resultados, indiretamente, corroboram essa proposta, uma vez que a lesão no PPT por si só não foi capaz de promover uma alteração na arquitetura do sono, assim como observado em outros estudos (LU *et al.*, 2006; PETROVIC *et al.*, 2013). No entanto, observamos um efeito da lesão apenas quando em associação a uma modulação dos receptores dopaminérgicos, evidenciando um importante papel do sistema dopaminérgico. Além disso, observamos uma correlação positiva ( $r=0,51$ ,  $p\leq 0,05$ ) entre os níveis de dopamina na SNpc e o tempo despendido em sono REM para os animais que receberam piribedil. O fato de não termos encontrado correlação entre esses mesmos parâmetros para os animais que receberam raclopride ( $r=0,06$ ,  $p=0,74$ ) e para os animais que receberam apenas o veículo ( $r=-0,10$ ,  $p=0,64$ ) indica mais uma vez uma importante influência do sistema dopaminérgico na regulação do sono REM.

Sabe-se que o PPT e a SNpc possuem um padrão de aferências e eferências, conservados evolutivamente, altamente similar (MENA-SEGOVIA; BOLAM; MAGILL, 2004). Além disso, essas estruturas possuem grande interação entre si, uma vez que existem projeções colinérgicas e glutamatérgicas do PPT para a SNpc (BENINATO; SPENCER, 1987; MENA-SEGOVIA; WINN; BOLAM, 2008). Jenkins e colaboradores (2002) observaram que uma lesão no PPT não foi capaz de promover uma diminuição dos níveis de DA no estriado, enquanto Forster e Blaha (2003) demonstraram que a estimulação do PPT promoveu um aumento do influxo de DA no estriado, apontando para uma interação com certo grau de independência. Observa-se que essas características em comum entre essas estruturas promovem também uma semelhança funcional, uma vez que ambas estão envolvidas no comportamento motor e em processos de aprendizagem (MENA-SEGOVIA; WINN; BOLAM, 2008). A partir disso, dos resultados obtidos nesse estudo e da observação de distúrbios relacionados ao sono em doenças que atingem principalmente neurônios dopaminérgicos, é coerente propor a associação dessas estruturas em relação a mais uma função: a regulação do sono REM.

Com base na hipótese do envolvimento do sistema dopaminérgico na regulação do sono REM proposta por Lima (2013) e nos resultados encontrados nesse estudo, é possível sugerir que o aumento na quantidade de sono REM, ora

promovido pelo raclopride (em animais sham), ora promovido pelo piribedil (em animais lesionados), aponta claramente para uma modulação do sistema dopaminérgico dependente das aferências colinérgicas e glutamatérgicas que partem do PPT.

Alguns trabalhos demonstram o efeito de lesões nos diferentes gânglios da base (LAZARUS *et al.*, 2012). Mena-Segovia e colaboradores (2002) observaram que lesões no estriado provocaram uma hiperlocomção em ratos e que, após 30 dias, quando o comportamento locomotor anormal já havia desaparecido, ocorreu um aumento significativo do tempo despendido em vigília, com uma diminuição no sono não-REM. Sabe-se que o aumento da locomoção nessa situação é proveniente da perda da inibição para o tálamo (REINER *et al.*, 1988). Uma vez que o globo pálido interno (GPi) e a substância negra pars reticulata (SNr) são as estruturas responsáveis pela inibição do tálamo e estudos demonstram que existem projeções GABAérgicas inibitórias que partem da SNr para o PPT, a perda da inibição que parte dessas estruturas também poderia explicar o aumento da ativação cortical (MENA-SEGOVIA *et al.*, 2002).

Dessa forma, com base nessa possível via para a ativação cortical, pode-se estabelecer uma pequena alça de regulação pela qual a modulação dos receptores dopaminérgicos seja influenciada pelo PPT. Nessa alça existiria o envolvimento das seguintes estruturas: PPT, projetando-se para a SNpc e para os gânglios da base; SNpc, projetando-se para o estriado; estriado (receptores D<sub>2</sub>), modulando a atividade dos neurônios estriatais e, conseqüentemente, modulando os demais gânglios da base (FIGURA 10).

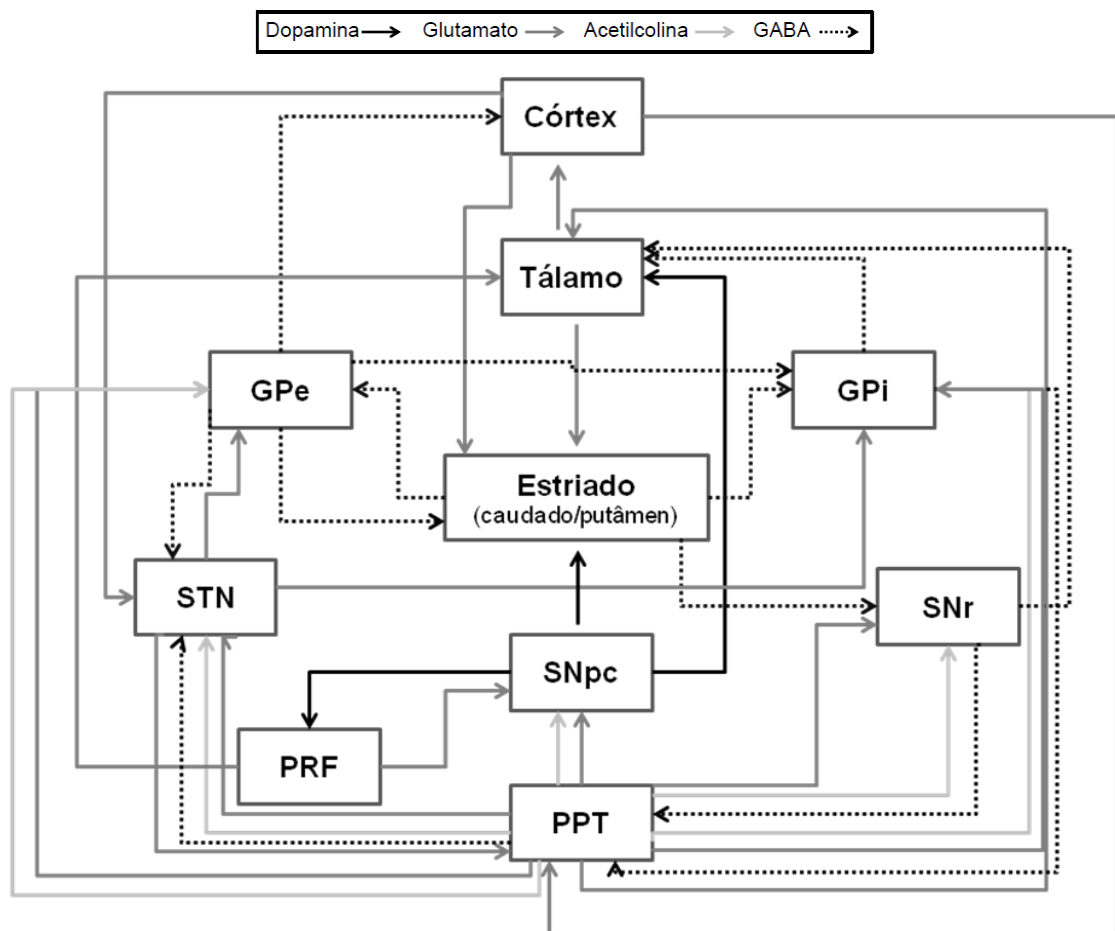


FIGURA 10. Representação esquemática das interações entre o PPT, SNpc, estriado e demais gânglios da base, de acordo com a proposta discutida. Observa-se uma grande semelhança no padrão de aferências/eferências, além de grande reciprocidade entre as estruturas. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; SNpc, substância negra pars compacta; SNr, substância negra pars reticulata; STN, núcleo subtalâmico; PPT, tegmento pedúnculo-pontino; PRF, formação reticular pontina. Adaptado de Mena-Segovia *et al.* (2004), Lazarus *et al.* (2012), Lima (2013),

Obviamente, muitos estudos ainda são necessários para elucidar as possíveis vias pelas quais os neurônios do PPT e da SNpc interagem para promover o sono REM. No entanto, o envolvimento dos gânglios da base pode ser essencial nessa interação, principalmente levando em conta as semelhanças nos padrões de aferências e eferências e enorme reciprocidade das estruturas, com funções muito parecidas. Mais especificamente, a tríade, constituída pelo PPT, SNpc e estriado, devem compor um centro de integração de funções neurofisiológicas tendo no sono REM um dos principais arcabouços. Nesse momento, o intrigante desafio é elucidar quais vias dentro desse contexto estão regulando ou apenas modulando a locomoção, o aprendizado e o ciclo vigília-sono.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em relação ao perfil motor, não se observou efeito da lesão no PPT, da modulação dos receptores dopaminérgicos do tipo D<sub>2</sub> e da privação de sono REM tanto isoladamente quanto quando em associação.

- No teste de memória (RDO), observamos que a lesão com ácido ibotênico no PPT promoveu um provável prejuízo de atenção e que a privação de sono REM foi capaz de reverter esse prejuízo, aumentando o tempo de exploração do objeto não-familiar em relação ao objeto familiar.

- Em relação aos dados obtidos a partir do registro de sono dos animais, observamos uma interação entre privação de sono REM, lesão no PPT e modulação dos receptores dopaminérgicos estriatais do tipo D<sub>2</sub>. O efeito do bloqueio ou ativação dos receptores dopaminérgicos só foi observado mediante a privação de sono REM e dependente da presença ou ausência da lesão no PPT.

- A quantificação neuroquímica demonstrou que os níveis dopaminérgicos foram influenciados pela modulação dos receptores D<sub>2</sub>, tanto na SNpc como no estriado.

- Foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis dopaminérgicos da SNpc e a porcentagem de tempo despendida em sono REM no grupo piribedil, evidenciando uma influência desse neurotransmissor na regulação do sono REM.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, T.; HAVEKES, R.; SALETIN, J. M.; WALKER, M. P. Sleep, Plasticity and Memory from Molecules Review to Whole-Brain Networks. **Current Biology**, v. 23, p. 774–788, 2013.
- ALDERSON, H. L.; FAULCONBRIDGE, L. F. H.; GREGORY, L. P.; LATIMER, M. P.; WINN, P. Behavioural sensitisation to repeated d-amphetamine: effects of excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. **Neuroscience**, v. 118, p. 311–315, 2003.
- ALLADA, R.; SIEGEL, J. M. Unearthing the Phylogenetic Roots of Sleep. **Curr Biol**, v. 18, p. 670–679, 2008.
- ANDERSEN, M. L.; DO VALLE, A. C.; TIMO-IARIA, C.; TUFIK, S. **Implantação de elétrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato**. São Paulo: UNIFESP, 2001.
- ASERINSKY, E.; KLEITMAN, N. Regularly occurring periods of eye motility and concomitant phenomena during sleep. **Science**, v. 118, p. 273–274, 1953.
- ASTON-JONES, G.; CHEN, S.; ZHU, Y.; OSHINSKY, M. L. A neural circuit for circadian regulation of arousal. **Nature neuroscience**, v. 4, p. 732–738, 2001.
- BARRAUD, Q.; LAMBRECQ, V.; FORNI, C.; MCGUIRE, S.; HILL, M.; BIOULAC, B. et al. Sleep disorders in Parkinson's disease: the contribution of the MPTP non-human primate model. **Exp Neurol**, v. 219, p. 574–582, 2009.
- BAUDONNAT, M.; HUBER, A.; DAVID, V.; WALTON, M. Heads for learning, tails for memory: reward, reinforcement and a role of dopamine in determining behavioral relevance across multiple time scales. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, 2013.
- BENINATO, M.; SPENCER, R. F. A cholinergic projection to the rat substantia nigra from the pedunculopontine tegmental nucleus. **Brain Res**, v. 412, p. 169–174, 1987.
- BERGER, H. U"ber das Elektrenkephalogramm des Menschen. **Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten**, v. 87, p. 527–570, 1929.
- BERSON, D. M. Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. **Trends in neurosciences**, v. 26, p. 314–320, 2003.
- BLUMBERG, M. S. Homology, correspondence, and continuity across development: the case of sleep. **Dev Psychobiol**, v. 55, p. 92–100, 2013.
- BORN, J.; WILHELM, I. System consolidation of memory during sleep. **Psychological Research**, v. 76, p. 192–203, 2012.
- BORTOLANZA, M.; WIETZIKOSKI, E. C.; BOSCHEN, S. L.; DOMBROWSKI, P.; LATIMER, M.; MACLAREN, D.; WINN, P.; CUNHA, C. Functional disconnection of

the substantia nigra pars compacta from the pedunculopontine nucleus impairs learning of a conditioned avoidance task. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 94, p. 229–239, 2010.

BROWN, R. E.; SERGEEVA, O.; ERIKSSON, K. S.; HAAS, H. L. Orexin A excites serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 457–459, 2001.

BROWN, R. E.; BASHEER, R.; MCKENNA, J. T.; STRECKER, R. E.; MCCARLEY, R. W. Control of sleep and wakefulness. **Physiol Rev**, v. 92, p. 1087–1187, 2012.

CALABRESI, P.; CASTRIOTO, A.; FILIPPO, M.; PICCONI, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 12, p. 811–821, 2013.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and Management. **Lancet Neurol**, v. 5, p. 235–245, 2006.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. V. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet Neurol**, v. 8, p. 464–474, 2009.

CHOU, T. C.; BJORKUM, A. A.; GAUS, S. E.; LU, J.; SCAMMELL, T. E.; SAPER, C. B. Afferents to the Ventrolateral Preoptic Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 977–990, 2002.

CHOU, T. C.; SCAMMELL, T. E.; GOOLEY, J. J.; GAUS, S. E.; SAPER, C. B.; LU, J. Critical Role of Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in a Wide Range of Behavioral Circadian Rhythms. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 10691–10702, 2003.

CHU, N.; BLOOM, F. E. Norepinephrine-Containing Neurons: Changes in Spontaneous Discharge Patterns during Sleeping and Waking. **Science**, v. 179, p. 908–910, 1973.

DAHAN, L.; ASTIER, B.; VAUTRELLE, N.; URBAIN, N.; KOCSIS, B.; CHOUVET, G. Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 1232–1241, 2007.

DAHL, C. B.; GOTESTAM, G. K. An Open Field Study of Antidepressant Drugs. **Pharmacology & Toxicology**, v. 64, p. 302–307, 1989.

DATTA, S. Cellular basis of pontine ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. **Cell and Molecular Neurobiology**, v. 17, p. 341–365, 1997.

DATTA, S.; PATTERSON, E.H.; SIWEK, D.F. Endogenous and exogenous nitric oxide in the pedunculopontine tegmentum induces sleep. **Synapse**, v. 27, p. 69–78, 1997.

DATTA, S.; PATTERSON, E. H.; SPOLEY, E. E. Excitation of the pedunculo pontine tegmental NMDA receptors induces wakefulness and cortical activation in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, p. 109–116, 2001.

DATTA, S. Evidence that REM sleep is controlled by the activation of brain stem pedunculo pontine tegmental kainate receptor. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, p. 1790–1798, 2002.

DATTA, S.; SIWEK, D.F. Single cell activity patterns of pedunculo pontine tegmentum neurons across the sleep–wake cycle in the freely moving rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, p. 611–621, 2002.

DATTA, S.; MACLEAN, R. R. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. **Neuroscience and Biobehavioral reviews**, v. 31, p. 775–824, 2007.

DATTA, S. Cellular and chemical neuroscience of mammalian sleep. **Sleep Medicine**, v. 11, p. 431–440, 2010.

DELLU, F.; MAYO, W.; CHERKAoui, J.; LEMOAL, M.; SIMON, H. Learning disturbances following excitotoxic lesion of cholinergic pedunculo pontine nucleus in the rat. **Brain Res**, v. 544, p. 126–131, 1991.

DEMENT, W.; KLEITMAN, N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 9, p. 673–690, 1957a.

DEMENT, W.; KLEITMAN, N. The relation of eye movements during sleep to dream activity: an objective method for the study of dreaming. **Journal of Experimental Psychology**, v. 53, p. 339–346, 1957b.

DEMENT, W. the occurrence of low voltage, fast, electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat. EEG Clin. **Neurophysiol**, v. 10, p. 291–296, 1958.

DEURVEILHER, S.; SEMBA, K. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. **Brain Research**, v. 987, p. 100–106, 2003.

DOS SANTOS, A. C. D.; CASTRO, M. A. V.; JOSE, E. A. K.; DELATTRE, A. M.; DOMBROWSKI, P.; DA CUNHA, C.; FERRAZ, A. C.; LIMA, M. M. S. REM Sleep Deprivation Generates Cognitive and Neurochemical Disruptions in the Intranigral Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, p. 1508–1516, 2013.

DUNMYRE, J. R.; MASHOUR, G. A.; BOOTH, V. Coupled Flip-Flop Model for REM Sleep Regulation in the Rat. **Plos one**, v. 9, p. 1–16, 2014.

DZIRASA, K.; RIBEIRO, S.; COSTA, R.; SANTOS, L. M.; LIN, S.; GROSMARK, A.; SOTNIKOVA, T.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G.; NICOLELIS, M. A. L.

Dopaminergic Control of Sleep–Wake States. **The Journal of neuroscience**, v. 26, p. 10577-10589, 2006.

ECKART, C.; FUENTEMILLA, L.; BAUCH, E. M.; BUNZECK, N. Dopaminergic stimulation facilitates working memory and differentially affects prefrontal low theta oscillations. **NeuroImage**, v. 94, p. 185–192, 2014.

EDER, D. N.; ZDRAVKOVIC, M.; WILDSCHIØDTZ, G. Selective alterations of the first NREM sleep cycle in humans by a dopamine D1 receptor antagonist (NNC-687). **J Psychiatr Res**, v. 37, p. 305–312, 2003.

ELLENBOGEN, J. M.; PAYNE, J. D.; STICKGOLD, R. The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 16, p. 716–722, 2006.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. **Behav. Brain Res.**, v. 31, p. 47-59, 1988.

ENNACEUR, A., MICHALIKOVA, S., BRADFORD, A., AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behav. Brain Res.**, v. 159, p. 247-266, 2005.

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; CHAZOT, P. L. Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. **Behavioural Brain Research**, v. 197, p. 417–434, 2009.

FAHN, S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. **Ann N Y Acad Sci**, v. 991, p. 1-14, 2003.

FERRAYE, M. U.; DEBU, B.; FRAIX, V.; KRACK, P.; CHARBARDE`S, S.; SEIGNEURET, E.; BENABID, L.; POLLAK, P. Subthalamic nucleus versus pedunclopontine nucleus stimulation in Parkinson disease: synergy or antagonism? **J Neural Transm**, v. 118, p. 1469–1475, 2011.

FOGEL, S. M.; SMITH, C. T.; COTE, K. A. Dissociable learning-dependent changes in REM and non-REM sleep in declarative and procedural memory systems. **Behav Brain Res**, v. 180, p. 48–61, 2007.

FORSTER, G. L.; BLAHA, C. D. Pedunclopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. **Eur J Neurosci**, v. 17, p. 751-62, 2003.

GAIS, S.; MÖLLE, M.; HELMS, K.; BORN, J. Learning-dependent increases in sleep spindle density. **J Neurosci**, v. 22, p. 6830–6834, 2002.

GOTTESMANN, C. Introduction to the neurophysiological study of sleep: central regulation of skeletal and ocular activities. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 135, p. 279–314, 1997.



GOUTAGNY, R. LUPPI, P. H.; SALVERT, D.; LAPRAY, D.; GERVASONI, D.; FORT, P. Role of the dorsal paragigantocellular reticular nucleus in paradoxical (rapid eye movement) sleep generation: a combined electrophysiological and anatomical study in the rat. **Neuroscience**, v. 152, p. 849-857, 2008.

GRAVES, L.; PACK, A.; ABEL, T. Sleep and memory: a molecular perspective. **Trends Neurosci**, v. 24, p. 237-243, 2001.

GROCH, S.; WILHELM, I.; DIEKELMANN, S.; BORN, J. The role of REM sleep in the processing of emotional memories: Evidence from behavior and event-related potentials. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 99, p. 1-9, 2013.

GUÉNOLÉ, F.; CHEVRIER, E.; STIP, E.; GODBOUT, R. A microstructural study of sleep instability in drug-naïve patients with schizophrenia and healthy controls: Sleep spindles, rapid eyemovements, and muscle atonia. **Schizophrenia Research**, v. 155, p. 31-38, 2014.

HASSELMO, M. E.; MCGAUGHY, J. High acetylcholine levels set circuit dynamics for attention and encoding and low acetylcholine levels set dynamics for consolidation. **Prog Brain Res**, v. 145, p. 207-231, 2004.

HERNANDEZ, P. J.; ABEL, T. A molecular basis for interactions between sleep and memory. **Sleep Med Clin**, v. 6, p. 71-84, 2011.

HOBSON, J.A.; MCCARLEY, R.W.; WYZINSKI, P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. **Science**, v. 189, p. 55-58, 1975.

HOMS-ORMO, S.; ANDREU, M.; MARÍN, N. S.; GARCÍA, R. A.; BERNAL, I. M. Effects of pedunculo pontine tegmental nucleus lesions on emotional reactivity and locomotion in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 59, p. 495-503, 2003.

HOSP, J. A.; LUFT, A. R. Dopaminergic meso-cortical projections to M1: role in motor learning and motor cortex plasticity. **Frontiers in Neurology**, v. 4, p. 1-7, 2013.

HU, Z.; LEE, C.; SHAH, V. K.; OH, E.; HAN, J.; BAE, J.; LEE, K.; CHONG, M.; HONG, J. T.; OH, K. Cordycepin Increases Nonrapid Eye Movement Sleep via Adenosine Receptors in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

HYACINTHE, C.; BARRAUD, Q.; TISON, F.; ERWAN, B.; GHORAYEB, I. D1 receptor agonist improves sleep-wake parameters in experimental parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 63, p. 20-24, 2014.

IBER, C.; ANCOLI-ISRAEL, S.; CHESSON, A. L.; QUAN, S. F. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: rules, terminology and technical specifications. 1st ed. Westchester, IL: **American Academy of Sleep Medicine**, 2007.

INGLIS, W. L.; OLMSTEAD, M. C.; ROBBINS, T. W. Selective deficits in attentional performance on the 5-choice serial reaction time task following pedunclopontine tegmental nucleus lesions. **Behav Brain Res**, v. 123, p. 117–131, 2001.

IZQUIERDO, I. **Memória**. São Paulo: Artmed, 2002.

JAEGERA, X.; CAMMAROTA, M.; PRADO, M. A. M.; IZQUIERDO, I.; PRADO, V. F.; PEREIRA, G. S. Decreased acetylcholine release delays the consolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 238, p. 62–68, 2013.

JENKINS, T. A.; LATIMER, M. P.; ALDERSON, H. L.; WINN, P. Determination of acetylcholine and dopamine content in thalamus and striatum after excitotoxic lesions of the pedunclopontine tegmental nucleus in rats. **Neuroscience Letters**, v. 322, p. 45–48, 2002.

JENKINSON, N.; NANDI, D.; MUTHUSAMY, K.; RAY, N. J.; GREGORY, R.; STEIN, J. F.; AZIZ, T. Z. Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Pedunclopontine Nucleus. **Movement Disorders**, v. 24, p. 319–328, 2009.

JOUVET, M. Paradoxical sleep—a study of its nature and mechanisms. **Progress in Brain Research**, v. 18, p. 20–62, 1965.

JOUVET, M.; MICHEL, F. Corrélations électromyographiques du sommeil chez le Chat décortiqué et mésencéphalique chronique. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 153, p. 422–425, 1959.

KANTOR, S.; MOCHIZUKI, T.; JANISIEWICZ, A. M.; CLARK, E.; NISHINO, S.; SCAMMELL, T. E. Orexin neurons are necessary for the circadian control of REM sleep. **Sleep**, v. 32, p. 1127–1134, 2009.

KLAUE, R. Die bioelektrische Tätigkeit der Grosshirnrinde im normalen Schlaf und in der Narkose durch Schlafmittel. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 47, p. 510–531, 1937.

KOSTIN, A.; MCGINTY, D.; SZYMUSIAK, R.; ALAM, M. N. Mechanisms mediating effects of nitric oxide on perifornical lateral hypothalamic neurons. **Neuroscience**, v. 220, p. 179–190, 2012.

KROPF, W.; KUSCHINSKY, K. Effects of stimulation of dopamine D1 receptors on the cortical EEG in rats: different influences by a blockade of D2 receptors and by an activation of putative dopamine autoreceptors. **Neuropharmacology**, v. 32, p. 493–500, 1993.

KRUEGER, J. M.; OBAL, J. R. Sleep function. **Front in Biosciences**, v. 8, p. 511–519, 2003.

LAGOS, P.; SCORZA, C.; MONTI, J. M. et al. Effects of the D3 preferring dopamine agonist pramipexole on sleep and waking, locomotor activity and striatal dopamine release in rats. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 8, p. 113–120, 1998.

LALOUX, C.; DERAMBURE, P.; HOUDAYER, E.; JACQUESSON, J.; BORDET, R.; DESTÉE, A.; MONACA, C. Effect of dopaminergic substances on sleep /wakefulness in saline- and MPTP-treated mice. **J. Sleep Res**, v. 17, p. 101–110, 2008.

LANE, E.; DUNNETT, S. Animal models of Parkinson's disease and L-dopa induced dyskinesia: how close are we to the clinic? **Psychopharmacology** (Berl), v. 199, p. 303-12, 2008.

LANG, E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease: First of two parts. **N. England. J. Med**, v. 339, 1044-1053, 1998.

LAZARUS, M.; HUANG, Z.; LU, J.; URADE, Y.; CHEN, J. How do the basal ganglia regulate sleep–wake behavior? **Trends in Neurosciences**, v. 35, p. 723-732, 2012.

LEE, M. G.; HASSANI, O. K.; JONES, B. E. Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. **J Neurosci**, v. 25, p. 6716–6720, 2005.

LENA, I.; PARROT, S.; DESCHAUX, O.; MUFFAT-JOLY, S.; SAUVINET, V.; RENAUD, B.; SUAUD-CHAGNY, M. F.; GOTTESMANN, C. Variations in Extracellular Levels of Dopamine, Noradrenaline, Glutamate, and Aspartate Across the Sleep–Wake Cycle in the Medial Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens of Freely Moving Rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, p. 891–899, 2005.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. B. F.; TUFIK, S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. **PLoS ONE**, 2007.

LIMA, M. M. S.; ANDERSEN, M. L.; REKSIDLER, A. B.; SILVA, A.; ZAGER, A.; ZANATA, S. M.; VITAL, M. A.; TUFIK, S. Blockage of dopaminergic D(2) receptors produces decrease of REM but not of slow wave sleep in rats after REM sleep deprivation. **Behav Brain Res**, v. 188, p. 406-11, 2008.

LIMA, M. M. S.; REKSIDLER, A. B.; VITAL, M. A. The dopaminergic dilemma: Sleep or wake? Implications in Parkinson's disease. **Bioscience Hypothesis**, v. 1, p. 9-13, 2008.

LIMA, M. M. S.; MARTINS, E. F.; DELATTRE, A. M.; PROENCA, M. B.; MORI, M. A.; CARABELLI, B.; FERRAZ, A. C. Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease - a Review of Clinical and Experimental Studies. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, 2012.

LIMA, M. M. S. Sleep disturbances in Parkinson's disease: The contribution of dopamine in REM sleep regulation. **Sleep Medicine Reviews**, 2013.

LIN, J.; SERGEEVA, O. A.; HAAS, H. L. Histamine H3 Receptors and Sleep-Wake Regulation. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 336, p. 17-23, 2011.

LIU, R.H.; FUNG, S.J.; REDDY, V.K.; BARNES, C.D. Localization of glutamatergic neurons in the dorsolateral pontine tegmentum projecting to the spinal cord of the cat

with a proposed role of glutamate on lumbar motoneuron activity. **Neuroscience**, v. 64, p. 193–208, 1995.

LOOMIS, A. L.; HARVEY, E. N.; HOBART, G. Potential rhythms of the cerebral cortex during sleep. **Science**, v. 81, p. 597–598, 1935.

LOOMIS, A. L.; HARVEY, E. N.; HOBART, G. Electrical potentials of the human brain. **Journal of experimental psychology**, v. 3, p. 249–279, 1936.

LOOMIS, A. L.; HARVEY, E. N.; HOBART, G. Cerebral states during sleep, as studied by human brain potentials. **Journal of Experimental Psychology**, v. 21, p. 127–144, 1937.

LU, J.; GRECO, M. A.; SHIROMANI, P.; SAPER, C. B. Effect of Lesions of the Ventrolateral Preoptic Nucleus on NREM and REM Sleep. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 3830–3842, 2000.

LU, J.; ZHANG, Y. H.; CHOU, T. C.; GAUS, S. E.; ELMQUIST, J. K.; SHIROMANI, P.; SAPER, S. P. Contrasting Effects of Ibotenate Lesions of the Paraventricular Nucleus and Subparaventricular Zone on Sleep–Wake Cycle and Temperature Regulation. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 4864–4874, 2001.

LU, J.; SHERMAN, D.; DEVOR, M.; SAPER, C. B. A putative flip-flop switch for control of REM sleep. **Nature**, v. 441, p. 589–594, 2006.

LU, B. S.; ZEE, P. C. Neurobiology of sleep. **Clin Chest Med**, v. 31, p. 309–318, 2010.

LUO, J.; PHAN, T. X.; YANG, Y.; GARELICK, M. G.; STORM, D. R. Increases in cAMP, MAPK Activity, and CREB Phosphorylation during REM Sleep: Implications for REM Sleep and Memory Consolidation. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 6460–6468, 2013.

LUPPI, P.; GERVASONI, D.; VERRET, L.; GOUTAGNY, R.; PEYRON, C.; SALVERT, D.; LEGER, L.; FORT, P. Paradoxical (REM) sleep genesis: The switch from an aminergic–cholinergic to a GABAergic–glutamatergic hypothesis. **Journal of Physiology**, v. 100, p. 271–283, 2007.

LYAMIN, O. I.; LAPIERRE, J. L.; KOSENKO, P. O.; MUKHAMETOV, L. M.; SIEGEL, J. M. Electroencephalogram asymmetry and spectral power during sleep in the northern fur Seal. **J. Sleep Res**, v. 17, p. 154–165, 2008.

MACHADO, R. B.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Sleep homeostasis in rats assessed by a long-term intermittent paradoxical sleep deprivation protocol. **Behavioural Brain Research**, v. 160, p. 356–364, 2005.

MAROUN, M.; AKIRAV, I. Arousal and Stress Effects on Consolidation and Reconsolidation of Recognition Memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 394–405, 2008.

MATURANA, M. J.; PUDELL, C.; TARGA, A. D. S.; RODRIGUES, L. S.; NOSEDA, A. C. D.; FORTES, M. H.; SANTOS, P.; DA CUNHA, C.; ZANATA, S. M.; FERRAZ, A. C.; LIMA, M. M. S. REM Sleep Deprivation Reverses Neurochemical and Other Depressive-Like Alterations Induced by Olfactory Bulbectomy. **Molecular Neurobiology**, 2014.

MCCARLEY, R.W.; HOBSON, J.A. Discharge patterns of cat pontine brain stem neurons during desynchronized sleep. **Journal of Neurophysiology**, v. 38, p. 751–766, 1975.

MCCARLEY, R.W.; MASSAQUOI, S.G. A limit cycle mathematical model of the REM sleep oscillator system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 251, p. 1011–1029, 1986.

MCCARLEY, R.W.; MASSAQUOI, S.G. Neurobiological structure of the revised limit cycle reciprocal interaction model of REM cycle control. **J Sleep Res**, v. 1, p. 132–137, 1992.

MCCARLEY, R. W. Mechanisms and models of REM sleep control. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 142, p. 429–467, 2004.

MCCARLEY, R. W. Neurobiology of REM and NREM sleep. **Sleep Medicine**, v. 8, p. 302–330, 2007.

MENA-SEGOVIA, J.; CINTRA, L.; PROSPERO-GARCIA, O.; GIORDANO, M. Changes in sleep-waking cycle after striatal excitotoxic lesions. **Behavioural Brain Research**, v. 136, p. 475–481, 2002.

MENA-SEGOVIA, J.; BOLAM, J. P.; MAGILL, P. J. Pedunculo pontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? **Trends Neurosci**, v. 27, p. 585–588, 2004.

MENA-SEGOVIA, J.; WINN, P.; BOLAM, J. P. Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. **Brain research reviews**, v. 58, p. 265–271, 2008.

MENZ, M. M.; RIHM, J. R.; SALARI, N.; BORN, J.; KALISCH, R.; PAPE, H. C.; MARSHALL, L.; BÜCHEL, C. The role of sleep and sleep deprivation in consolidating fear memories. **NeuroImage**, v. 75, p. 87–96, 2013.

MICHEL, F.; KLEIN, M.; JOUVET, J.; VALATX, J. V. Etude polygraphique du sommeil chez le rat. **C.r. SOanc. Soc. Biol**, v. 155, p. 2389–2392, 1961.

MILLER, J.D.; FARBER, J.; GATZ, P.; ROFFWARG, H.; GERMAN, D.C. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and walking in the rat. **Brain Res**, v. 273, p. 133–141, 1983.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, p. 445–468, 1998.

MISTLBERGER, R. E. Circadian regulation of sleep in mammals: Role of the suprachiasmatic nucleus. **Brain Research Reviews**, v. 49, p. 429–454, 2005.

MOHAWK, J. A.; TAKAHASHI, J. S. Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. **Trends in Neurosciences**, v. 34, p. 349-358, 2011.

MONTI, J. M. Catecholamines and the sleep-wake cycle. I. EEG and behavioral arousal. **Life Sci**, v. 30, p. 1145-57, 1982.

MONTI, J. M.; MONTI, D. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. **Sleep Med Rev**, v. 11, p. 113-33, 2007.

MONTI, J. M.; JANTOS, H. The roles of dopamine and serotonin, and of their receptors, in regulating sleep and waking. **Prog Brain Res**, v. 172, p. 625–646, 2008.

MONTI, J. M. The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. **Sleep medicine reviews**, v. 14, p. 307-317, 2010.

MOORE, R. Y. Suprachiasmatic nucleus in sleep–wake regulation. **Sleep Medicine**, v. 8, p. 27–33, 2007.

MORUZZI, G.; MAGOUN, H. W. Brainstem reticular formation and activation of the EEG. **EEG Clin. Neurophysiol**, v. 1, p. 455-473, 1949.

MORUZZI, G. The sleep–waking cycle. **Ergeb Physiology**, v. 64, p. 1–165, 1972.

NITZ, D. A.; VAN SWINDEREN, B.; TONINI, G.; GREENSPAN, R. J. Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. **Curr Biol.**, v. 12, p. 1934–1940, 2002.

NUNES, G. P.; TUFIK, S. Validation of the modified multiple platform method (MMP) of paradoxical sleep deprivation in rats. **Sleep Res**, v. 22, p. 339, 1994.

OKURA, M.; RIEHL, J.; MIGNOT, E.; NISHINO, S. Sulpiride, a D2/D3 Blocker, Reduces Cataplexy but not REM Sleep in Canine Narcolepsy. **Europsychopharmacology**, v. 23, 2000.

ONGINI, E.; CAPORALI, M.G. Differential effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on EEG activity and behavior in the rat. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 355–360, 1987.

ONGINI, E.; DIONISOTTI, S.; TRAMPUS, M.; SAVOLDI, F. Effects of remoxipride, a dopamine D-2 on sleep-waking patterns and EEG activity in rats and rabbits antagonist antipsychotic. **Psychopharmacology**, v. 107, p. 236-242, 1992.

ONGINI, E.; BONIZZONI, E.; FERRI, N. et al. Differential effects of dopamine D-1 and D-2 receptor antagonist antipsychotics on sleep-wake patterns in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 266, p. 726–731, 1993.

PASSOUANT, P.; HALBERG, F.; GENICOT, R.; POPOVICIU, L.; BALDY-MOULINIER, M. Periodicity of narcoleptic attacks and the circadian rhythm of rapid sleep. **Rev Neurol**, v. 121, p. 155–164, 1969.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5th edition San Diego: Academic Press, 2005.

PETROVIC, J.; CIRIC, J.; LAZIC, K.; KALAUZI, A.; SAPONJIC, J. Lesion of the pedunculo pontine tegmental nucleus in rat augments cortical activation and disturbs sleep/wake state transitions structure. **Experimental Neurology**, v. 247, p. 562–571, 2013.

PIGNATELLI, M.; BEYELER, A.; LEINEKUGEL, X. Neural circuits underlying the generation of theta oscillations. **Journal of Physiology – Paris**, v. 106, p. 81–92, 2012.

PROENÇA, M. B.; DOMBROWSKI, P. A.; DA CUNHA, C.; FISCHER, L.; FERRAZ, A. C.; LIMA, M. M. S. Dopaminergic D2 receptor is a key player in the substantia nigra pars compacta neuronal activation mediated by REM sleep deprivation. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 118–126, 2014.

PUIG, V.; MILLER, E. K. Neural Substrates of Dopamine D2 Receptor Modulated Executive Functions in the Monkey Prefrontal Cortex. **Cerebral cortex**, 2014.

QU, W.; XU, X.; YAN, M.; WANG, Y.; URADE, Y.; HUANG, Z. Essential Role of Dopamine D2 Receptor in the Maintenance of Wakefulness, But Not in Homeostatic Regulation of Sleep, in Mice. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, p. 4382–4389, 2010.

QUATTROCHI, J.J.; MAMELAK, A.N.; MADISON, R.D.; MACKLIS, J.D.; HOBSON, J.A. Mapping neuronal inputs to REM sleep induction sites with carbachol-fluorescent microspheres. **Science**, v. 245, p. 984–986, 1989.

RAHMAN, A.; LANGUILLE, S.; LAMBERTY, Y.; BABILONI, C.; PERRET, M.; BORDET, R.; BLIN, O. J.; JACOB, T.; AUFFRET, A.; SCHENKER, E.; RICHARDSON, J.; PIFFERI, F.; AUJARD, F. Sleep Deprivation Impairs Spatial Retrieval but Not Spatial Learning in the Non-Human Primate Grey Mouse Lemur. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1–8, 2013.

RASCH, B.; POMMER, J.; DIEKELMANN, S.; BORN, J. Pharmacological REM sleep suppression paradoxically improves rather than impairs skill memory. **Nature neuroscience**, v. 12, 2009.

RASCH, B.; BORN, J. About sleep's role in memory. **Physiol Rev**, v. 93, p. 681–766, 2013.

RAUCHS, G.; FEYERS, D.; LANDEAU, B.; BASTIN, C.; LUXEN, A.; MAQUET, P.; COLLETTE, F. Sleep Contributes to the Strengthening of Some Memories Over Others, Depending on Hippocampal Activity at Learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 2563–2568, 2011.

RECHTSCHAFFEN, A.; KALES, A. **A manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects**. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 1968.

RECHTSCHAFFEN, A. Current perspectives on the function of sleep. **Perspect Biol Med**, v. 41, p. 359-390, 1998.

REINER, A.; ALBIN, R. L.; ANDERSON, K. D.; D'AMATO, C. J.; PENNEY, J. B.; YOUNG, A. B. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington disease (enkephalin/substance P/globus pallidus/substantia nigra/chorea). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 5733-5737, 1988.

REMPE, M. J.; BEST, J.; TERMAN, D. A mathematical model of the sleep/wake cycle. **J. Math. Biol.**, v. 60, p. 615–644, 2010.

RICHTER, C. P. Biological clocks in medicine and psychiatry: shock-phase hypothesis. **Physiology**, v. 46, p. 1506-1530, 1960.

ROBBINS, T. W.; COOLS, R. Cognitive Deficits in Parkinson's Disease: A Cognitive Neuroscience Perspective. **Movement Disorders**, v. 29, p. 597-607, 2014.

ROLDÁN, E.; WEISS, T. The cycle of sleep in the rat. **Bol. Inst. Est. Méd. Biol. Méx**, v. 20, p. 155-164, 1962.

ROPERT, N.; STERIADE, M. Input-output organization of midbrain reticular core. **Journal of Neurophysiology**, v. 46, p. 17–31, 1981.

ROTH, T. C.; RATTENBORG, N. C.; PRAVOSUDOV, V. V. The ecological relevance of sleep: the trade-off between sleep, memory and energy conservation. **Phil. Trans**, v. 365, p. 945–959, 2010.

RUBY, N. F.; FERNANDEZ, F.; GARRETT, A.; KLIMA, J.; ZHANG, P.; SAPOLSKY, R.; HELLER, C. Spatial Memory and Long-Term Object Recognition Are Impaired by Circadian Arrhythmia and Restored by the GABAA Antagonist Pentylenetetrazole. **PLOS ONE**, v. 8, 2013.

SAKAI, K. Some anatomical and physiological properties of pontomesencephalic tegmental neurons with special reference to the PGO waves and postural atonia during paradoxical sleep in the cat. The Reticular Formation Revisited. **Raven Press**, New York, p. 427–447, 1980.

SALMI, P.; MALMGREN, K.; SVENSSON, T. H.; AHLENIUS, S. Stimulation of forward locomotion by SCH-23390 and raclopride in d-amphetamine-treated rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 357, p. 593–599, 1998.



SANFORD, L.D.; MORRISON, A.R.; MANN, G.L.; HARRIS, J.S.; YOO, L.; ROSS, R.J. Sleep patterning and behaviour in cats with pontine lesions creating REM without atonia. **Journal of Sleep Research**, v. 3, p. 233–240, 1994.

SAPER, C. B.; SCAMMELL, T. E.; LU, J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. **Nature**, v. 437, p. 1257-1263, 2005.

SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; SCAMMELL, T. E. The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. **Trends in neurosciences**, v. 24, p. 726-731, 2001.

SCARNATI, E.; FLORIO, T.; CAPOZZO, A.; CONFALONE, G.; MAZZONE, P. The pedunculo pontine tegmental nucleus: implications for a role in modulating spinal cord motoneuron excitability. **J Neural Transm**, v. 118, p. 1409–1421, 2011.

SEI, H.; IKEMOTO, K.; ARAI, R.; MORITA, Y. Injection of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area suppresses the increase in arterial pressure during REM sleep in the rat. **Sleep Res Online**, v. 2, p. 1-6, 1999.

SHAPOVALOVA, K. B.; KAMKINA, Y. V. Motor and Cognitive Functions of the Neostriatum During Bilateral Blockade of Its Dopamine Receptors. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 38, p. 71-79, 2008.

SHERIN, J. E.; ELMQUIST, J. K.; TORREALBA, F.; SAPER, C. B. Innervation of Histaminergic Tuberomammillary Neurons by GABAergic and Galaninergic Neurons in the Ventrolateral Preoptic Nucleus of the Rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 4705–4721, 1998.

SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L. P.; RAMKUMAR, V. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 2024-2052, 2014.

SIEGEL, J. M. Functional implications of sleep development. **PLoS Biology**, v. 3, p. 756-758, 2005.

SIEGEL, J. M. Sleep viewed as a state of adaptive Inactivity. **Nature Reviews**, v. 10, p. 747-753, 2009.

SIEGEL, J. M. REM sleep: a biological and psychological paradox. **Sleep medicine reviews**, v. 15, p. 139-142, 2011.

SIMÓN, V. M.; PARRA, A.; MINARRO, J.; ARENAS, M. C.; VINADER-CAEROLS, C.; AGUILAR, M. A. Predicting how equipotent doses of chlorpromazine, haloperidol, sulpiride, raclopride and clozapine reduce locomotor activity in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 159–164, 2000.

SKINNER, R.D.; GARCIA-RILL, E. The mesencephalic locomotor region (MLR) in the rat. **Brain Res.**, v. 323, p. 385–389, 1984.

STECKLER, T.; INGLIS, W.; WINN, P.; SAHGAL, A. The pedunculo pontine tegmental nucleus: a role in cognitive processes? **Brain Research Reviews**, v. 19, p. 298-318, 1994.

STECKLER, T.; DRINKENBURG, W. H. I. M.; SAHGAL, A.; AGGLETON, J. P. Recognition memory in rats-ii. Neuroanatomical substrates. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 313-332, 1998.

STECKLER, T.; SAHGAL, A.; AGGLETON, J. P.; DRINKENBURG, W. H. I. M. Recognition memory in rats-iii. Neuroanatomical substrates. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 333-348, 1998.

STEINIGER, B.; KRETSCHMER, B. D. Effects of ibotenate pedunculo pontine tegmental nucleus lesions on exploratory behaviour in the open field. **Behavioural Brain Research**, v. 151, p. 17-23, 2004.

STEININGER, T.L.; RYE, D.B.; WAINER, B.H. Afferent projections to the cholinergic pedunculo pontine tegmental nucleus and adjacent midbrain extrapyramidal area in the albino rat. I. Retrograde tracing studies. **Journal of Comparative Neurology**, v. 321, p. 515-543, 1992.

STERIADE, M.; SAKAI, K.; JOUVET, M. Bulbo-thalamic neurons related to thalamocortical activation processes during paradoxical sleep. **Experimental Brain Research**, v. 54, p. 463-475, 1984.

STICKGOLD, R.; WALKER, M. P. Sleep-dependent memory consolidation and reconsolidation. **Sleep Medicine**, v. 8, p. 331-343, 2007.

SUCHECKI, D.; TUFIK, S. Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. **Physiology & Behavior**, v. 68, p. 309-316, 2000.

SY, H.; WU, S.; WANG, W.; CHEN, C.; HUANG, Y.; LIOU, Y.; CHIOU, C.; PAWLAK, C. R.; HO, Y. MPTP-induced dopaminergic degeneration and deficits in object recognition in rats are accompanied by neuroinflammation in the hippocampus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 95, p. 158-165, 2010.

THORSELL, A.; SLAWECKI, C. J.; KHOURY, A. E.; MATHE, A. A.; EHLERS, C. L. The effects of social isolation on neuropeptide Y levels, exploratory and anxiety-related behaviors in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 28 - 34, 2006.

TIMO-IARIA, C.; NEGRAO, N.; SCHMIDEK, W. R.; HOSHINO, K.; LOBATO DE MENEZES, C. E.; LEME DA ROCHA, T. Phases and states of sleep in the rat. **Physiol Behav**, v. 5, p. 1057-62, 1970.

TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. **Brain Res Bull**, v. 62, p. 143-150, 2003.

TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep function and synaptic homeostasis. **Sleep Med Rev**, v. 10, p. 49–62, 2006.

TONONI, G.; CIRELLI, C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. **Neuron**, v. 81, p. 12–34, 2014.

TRAMPUS, M.; FERRI, N.; MONOPOLI, A., et al. The dopamine D1 receptor is involved in the regulation of REM sleep in the rat. **Eur J Pharmacol**, v. 194, p. 189–194, 1991.

TSUNEMATSU, T.; TABUCHI, S.; TANAKA, K. F.; BOYDEN, E. S.; TOMINAGA, M.; YAMANAKA, A. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 255, p. 64–74, 2013.

TUFIK, S.; LINDSEY, C. J.; CARLINI, E. A. Does REM sleep deprivation induce a supersensitivity of dopaminergic receptors in the rat brain? **Pharmacology**, v. 16, 1978.

TUFIK, S. Increased responsiveness to apomorphine after REM sleep deprivation: supersensitivity of dopamine receptors or increase in dopamine turnover? **J. Pharm. Pharmacol**, v. 33, p. 732, 1981.

TUFIK, S.; TRONCONE, L.R.P.; BRAZ, S.; SILVA-FILHO, A.R.; NEUMANN, B.G. Does REM sleep deprivation induce subsensitivity of presynaptic dopamine or postsynaptic acetylcholine receptors in the brain? **Eur J Pharmacol**, v. 140, p. 215–219, 1987.

ULLOOR, J.; MAVANJI, V.; SAHA, S.; SIWEK, D.F.; DATTA, S. Spontaneous REM sleep is modulated by the activation of the pedunculopontine tegmental GABAB receptors in the freely moving rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, p. 1822–1831, 2004.

URADE, Y.; HAYAISHI, O. Prostaglandin D2 and sleep/wake regulation. **Sleep Medicine Reviews**, v. 15, p. 411–418, 2011.

VAN ALPHEN, B.; YAP, M. H. W.; KIRSZENBLAT, L.; KOTTLER, B.; VAN SWINDEREN, B. A dynamic deep sleep stage in *Drosophila*. **J Neurosci**, v. 33, p. 6917–6927, 2013.

VECSEY, C.G.; BAILLIE, G.S.; JAGANATH, D.; HAVEKES, R.; DANIELS, A.; WIMMER, M.; HUANG, T.; BROWN, K.M.; LI, X.Y.; DESCALZI, G.; KIM, S.S.; CHEN, T.; SHANG, Y.Z.; ZHUO, M.; HOUSLAY, M.D.; ABEL, T. Sleep deprivation impairs cAMP signalling in the hippocampus. **Nature**, v. 461, p. 1122–1125, 2009.

VERHAVE, P. S.; JONGSMA, M. J.; VAN DEN BERG, R. M.; VIS, J. C.; VANWERSCH, R. A. P.; SMIT, A. B.; VAN SOMEREN, E. J. W.; PHILIPPENS, I. REM Sleep Behavior Disorder in the Marmoset MPTP Model of Early Parkinson Disease. **Sleep**, v. 34, p. 1119–1125, 2011.

VERTES, R. P. Brain stem activation of the hippocampus: a role for the magnocellular reticular formation and the MLF. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 50, p. 48–58, 1980.

VERTES, R. P. Brainstem control of the events of REM sleep. **Progress in Neurobiology**, v. 22, p. 241–288, 1984.

VOLKOW, N. D.; TOMASI, D.; WANG, G.; TELANG, F.; FOWLER, J. S.; WANG, R. L.; LOGAN, J.; WONG, C.; JAYNE, M.; SWANSON, J. M. Hyperstimulation of striatal D2 receptors with sleep deprivation: Implications for cognitive impairment. **Neuroimage**, v. 45, p. 1232–1240, 2009.

VON ECONOMO. Sleep as a problem of localization. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, v. 71, p. 1-5, 1930.

XIE, L.; KANG, H.; XU, Q.; CHEN, M.; LIAO, Y.; THIYAGARAJAN, M.; O'DONNELL, J.; CHRISTENSEN, D. J.; NICHOLSON, C.; ILIFF, J. J.; TAKANO, T.; DEANE, R.; NEDERGAARDI, M. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. **Science**, v. 342, p. 373-377, 2013.

WALKER, S. C.; WINN, P. An assessment of the contributions of the pedunculopontine tegmental and cuneiform nuclei to anxiety and neophobia. **Neuroscience**, v. 150, p. 273–290, 2007.

WANG, W.F.; WU, S.L.; LIOU, Y.M.; WANG, A.L.; PAWLAK, C.R.; HO, Y.J. MPTP lesion causes neuroinflammation and deficits in object recognition in Wistar rats. **Behav Neurosci.**, v. 123, p. 1261-1270, 2009.

WATTS, A.; GRITTON, H. J.; SWEIGART, J.; POE, G. R. Antidepressant Suppression of Non-REM Sleep Spindles and REM Sleep Impairs Hippocampus-Dependent Learning While Augmenting Striatum-Dependent Learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 13411–13420, 2012.

WESCHENFELDER, J.; SANDER, C.; KLUGE, M.; KIRKBY, K. C.; HIMMERICH, H. The influence of cytokines on wakefulness regulation: clinical relevance, mechanisms and methodological problems. **Psychiatria Danubina**, v. 24, p. 112-126, 2012.

WINN, P. How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: Evidence from animal studies. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 248, p. 234 – 250, 2006.

ZHANG, Q.; LIU, J.; WANG, Y.; WANG, S.; WU, Z. H.; YAN, W.; HUI, Y. P.; ALI, U. The firing activity of presumed cholinergic and non-cholinergic neurons of the pedunculopontine nucleus in 6-hydroxydopamine-lesioned rats: An in vivo electrophysiological study. **Brain Research**, v. 1234, p. 152-160, 2008.

## ANEXO



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 655

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

## CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

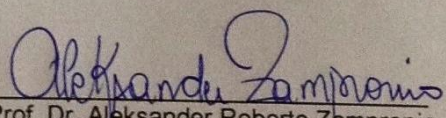
PROCESSO: 23075.037305/2012-41

APROVADO: 01/11/2012 – R.O. 10/2012

**TÍTULO:** Análise do envolvimento recíproco da substância negra pars compacta e do tegmento pedunculopontino na regulação do sono paradoxal no modelo animal de Parkinsonismo induzido por rotenona em ratos

**AUTORES:** Marcelo de Meira Santos Lima, Adriano Targa Dias Santos

DEPARTAMENTO: Fisiologia

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio  
Coordenador da CEUA